

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Avaliação da exposição à patulina de um grupo  
de crianças através do consumo de alimentos  
infantis à base de maçã – estudo piloto**

**Catarina da Cunha Valle Farinha Pereira**

DISSERTAÇÃO

MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE

2013

**UNIVERSIDADE DE LISBOA**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS**

DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



**Avaliação da exposição à patulina de um grupo  
de crianças através do consumo de alimentos  
infantis à base de maçã – estudo piloto**

**Catarina da Cunha Valle Farinha Pereira**

**Orientada por:**

**Doutora Elsa Vasco** - Departamento de Alimentação e Nutrição, Instituto Nacional de Saúde  
Dr. Ricardo Jorge de Lisboa, I.P.

**Professora Doutora Ana Maria Crespo** - Departamento de Biologia Animal, Faculdade de  
Ciências da Universidade de Lisboa.

**DISSERTAÇÃO**

**MESTRADO EM BIOLOGIA HUMANA E AMBIENTE**

**2013**



“Recomeça.. se puderes, sem angústia e  
sem pressa e os passos que deres, nesse  
caminho duro do futuro, dá-os em  
liberdade, enquanto não alcances não  
descanses, de nenhum fruto queiras só  
metade.”

(Miguel Torga)

## Resumo

As crianças constituem um grupo populacional vulnerável em virtude das suas características fisiológicas e metabólicas. Uma alimentação pouco segura pode provocar danos irreversíveis na sua saúde pelo que é importante desenvolver estudos de avaliação da exposição das crianças portuguesas a contaminantes presentes nos alimentos. As micotoxinas constituem um grupo de contaminantes químicos com impacto na saúde humana devido às suas propriedades cancerígenas, genotóxicas e mutagénicas. A patulina é uma micotoxina com particular interesse na área da alimentação infantil, dado que ocorre sobretudo em produtos à base de maçã, amplamente consumidos por este grupo populacional.

Face ao exposto, esta dissertação teve como objetivo a realização de um estudo piloto sobre a avaliação da exposição à patulina de um grupo de crianças, com idades até aos 36 meses, através do consumo de alimentos infantis à base de maçã. Para este estudo foi otimizada e adaptada para a língua portuguesa e para a Tabela da Composição dos Alimentos Portuguesa uma plataforma informática *online* desenvolvida e aplicada na Eslovénia, designada por OPEN. A sua aplicação como diário alimentar, durante três dias, permitiu obter dados pela primeira vez, sobre o consumo de produtos à base de maçã em 12 crianças portuguesas, registando-se um valor de ingestão média destes produtos de 86 g e 49 g, para sumos e purés à base de maçã, respetivamente.

A combinação dos dados de consumo com os teores de patulina em 14 produtos à base de maçã (dez sumos e quatro purés), com uma contaminação média de 2,13 µg/kg e 0,33 µg/kg respetivamente, permitiu obter os primeiros valores de avaliação da exposição à patulina de crianças portuguesas com idades compreendidas entre 0 e 36 meses. A ingestão diária de patulina estimada num pior caso de exposição possível foi de 0,0441 µg patulina/Kg peso corporal/dia, encontrando-se, no entanto, muito abaixo da dose diária admissível máxima provisória (DDAMP) que é de 0,43 µg patulina/Kg peso corporal/dia.

Face à ausência de referências bibliográficas, considera-se que, até à data, o presente estudo foi o primeiro realizado em Portugal relativamente à avaliação de exposição a patulina de crianças portuguesas através do consumo de alimentos infantis à base de maçã. O estudo efetuado embora não tenha valor estatístico permitiu criar todas as ferramentas necessárias a estudos de avaliação da exposição.

**Palavras-chave:** Alimentação infantil, diário alimentar, avaliação de exposição, micotoxinas, patulina.

## Abstract

Children are a particularly vulnerable population group because of their metabolic and physiological characteristics. An unsafe food may cause irreversible damage to their health, reason why is so important to develop studies to determine Portuguese children's exposure to food contaminants. Mycotoxins (secondary metabolites produced by fungi) are a group of chemical contaminants with major impact on human health due to their carcinogenic, mutagenic and genotoxic effect. Patulin is a mycotoxin with particular interest in infant feeding studies, as occurs particularly in apple-based products widely consumed by this population group.

In view of the above, this dissertation aims to carry out a pilot study on the exposure assessment of patulin in a children's group, aged between 0 and 36 months, through the consumption of infant food containing apple. An online platform developed and applied in Slovenia called OPEN was optimized and adapted to Portuguese, including the introduction of the Food Composition Database from Portugal. The new online platform, called OPEN Portugal, presents nutritional intake data in a functional form and allows the data storage, production and export of the food diaries in a standardized and sophisticated approach. Its application as a food diary (during three days) allowed the data acquisition, for the first time, on the consumption of apple-based products in 12 Portuguese children, registering an average intake value of 86 g of juices and 49 g of purees.

The combination of the consumption data with the patulin occurrence verified on 14 apple-based products (ten juices and four purees) with an average contamination of 2.13 µg/kg and 0.33 µg/kg respectively, has provided the first evaluation data on exposure to patulin in Portuguese children aged between 0 and 36 months. The estimated daily intake of patulin in a worst exposure scenario was 0.0441 µg patulin/Kg bw/day. However, this value is below the provisional maximum tolerable daily intake (PMTDI) of 0.43 µg patulin/Kg bw/day.

In the absence of references, it is considered that the present study was the first held in Portugal in relation to the exposure assessment to patulin in Portuguese children through consumption of infant food containing apple. Although the study carried out does not have statistical value, it allowed to create all the necessary tools to exposure assessment studies.

**Keywords:** Baby food, food diary, exposure assessment, mycotoxins, patulin.

## Agradecimentos

Começo por agradecer às minhas orientadoras, Doutora Elsa Vasco e Prof. Doutora Ana Crespo, por toda a disponibilidade, conhecimentos transmitidos, orientação científica prestada e acima de tudo, apoio incondicional e compreensão, sem os quais não seria possível a realização deste estudo. Agradeço também à Doutora Paula Alvito pela sua coorientação durante este ano de trabalho, pelo apoio, disponibilidade e conhecimento transmitido. As vossas sugestões no decorrer do estudo foram indispensáveis, sobretudo nos momentos mais difíceis.

Agradeço à Prof. Deodália Dias, Coordenadora do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, pelo apoio demonstrado.

À Carla Martins, o meu muito obrigado pela colaboração, dedicação, amizade e sobretudo, disponibilidade para me ensinar e acompanhar durante o trabalho experimental.

Faço um agradecimento especial à Ana, Fernanda, Francisco e Marina, por todo o carinho e amizade que demonstraram. A vossa companhia, alegria e força, foram imprescindíveis e uma motivação para mim.

O meu muito obrigado a todos os meus amigos, em particular à Ana, Filipa, Denise e Marta, que tão bem me acompanharam durante esta nova fase.

Aos meus Pais e irmã, agradeço todo o apoio e compreensão e, principalmente, por tudo de bom que me têm proporcionado. OBRIGADO!

# Índice

Resumo.....	i
Abstract.....	ii
Agradecimentos .....	iii
Índice.....	iv
Índice de figuras .....	vii
Índice de tabelas .....	viii
Índice de equações .....	ix
Índice de gráficos .....	ix
Referências .....	x
Lista de abreviaturas / siglas .....	x
Capítulo I – Introdução teórica.....	1
1.1 Crianças e a alimentação .....	1
1.1.1 Vulnerabilidade infantil .....	1
1.1.2 Alimentação infantil .....	3
1.2 O risco alimentar .....	4
1.2.1 Análise do risco: definições e características .....	4
1.2.2 Avaliação de exposição a contaminantes químicos.....	7
1.3 Consumo alimentar.....	8
1.3.1 Métodos de avaliação do consumo alimentar.....	9
1.3.2 Avaliação do consumo alimentar em crianças.....	12
1.4 Micotoxinas.....	13
1.4.1 Caracterização dos grupos de micotoxinas: Ocorrência e toxicidade .....	16
1.5 Patulina .....	21
1.6 Objetivos .....	26



Capítulo II - Metodologia .....	28
2.1 Tradução, adaptação e melhoria de uma plataforma informática <i>online</i> capaz de ser utilizada como diário alimentar .....	28
2.1.1 Seleção da plataforma informática para utilização como diário alimentar.....	28
2.2 OPEN - Plataforma nutricional online.....	29
2.2.1 Tradução para Português, adaptação e melhoria.....	30
2.3 Aplicação do diário alimentar a um grupo de crianças até dos 0 aos 3 anos de idade .....	32
2.3.1 Seleção da amostra .....	32
2.3.2 Os participantes .....	32
2.3.3 Aplicação do diário alimentar .....	32
2.3.4 Tratamento dos resultados.....	33
2.4.1 Amostras.....	34
2.4.2 Equipamentos .....	35
2.4.3 Materiais .....	35
2.4.4 Reagentes.....	36
2.4.5 Soluções .....	37
2.5 Técnica.....	37
2.5.1 Pesagem da amostra .....	38
2.5.2 Extração.....	38
2.5.5 Controlo de qualidade .....	41
2.5.6 Cálculos .....	41
2.6 Avaliação da exposição das crianças a patulina através do consumo de alimentos infantis à base de maçã .....	42
Capitulo III - Resultados e discussão.....	44
3.1 OPEN - Plataforma nutricional <i>online</i> .....	44

3.1.1	Página inicial .....	44
3.1.2	Identificação do utilizador .....	46
3.1.3	Lista de alimentos .....	48
3.1.4	Diário alimentar .....	50
3.1.5	Plano alimentar .....	53
3.1.6	Receitas .....	54
3.1.7	Ajuda .....	54
3.1.8	Discussão final .....	55
3.2	Avaliação do consumo alimentar .....	55
3.3	Ocorrência de patulina nas amostras em estudo .....	58
3.4	Estimativa da exposição das crianças .....	63
Capítulo IV - Conclusões e perspectivas futuras .....		66
Capítulo V - Bibliografia .....		69
Anexo I .....		78
Anexo II .....		79

## Índice de figuras

Figura 1: Mações contaminadas com bolor.....	22
Figura 2: Estrutura molecular da patulina. ....	23
Figura 3: Método de tradução da plataforma para a língua Portuguesa. ....	30
Figura 4: Método de tradução via programa informático UREDNIK. ....	31
Figura 5: Página inicial da OPEN original antes de ser adaptada para português.....	45
Figura 6: Página inicial da OPEN Portugal depois de ser adaptada para português. ....	45
Figura 7: Página da OPEN Portugal do perfil do utilizador. ....	47
Figura 8: Página da OPEN Portugal da lista de alimentos. ....	49
Figura 9: Página da OPEN Portugal para a pesquisa dos alimentos existentes na tabela da composição dos alimentos Portuguesa.....	50
Figura 10: Página da OPEN Portugal do diário alimentar e ingestão diária recomendada. ....	51
Figura 11: Unidades de medida apresentadas na OPEN Portugal.....	51
Figura 12: Avaliação nutricional disponibilizada na OPEN Portugal. ....	52
Figura 13: Página da OPEN Portugal do plano alimentar. ....	53
Figura 14: Assistência da OPEN Portugal.....	54
Figura 15: Exemplo de um cromatograma de uma amostra de puré naturalmente contaminada com patulina (0,99 µg/Kg).....	58
Figura 16: Exemplo de um cromatograma de uma amostra de sumo naturalmente contaminada com patulina (9,54 µg/Kg).....	59
Figura 17 Anexo I: Consentimento informado aos pais. ....	78

## Índice de tabelas

Tabela 1: Toxinas produzidas por diferentes géneros de fungos. ....	17
Tabela 2: Efeitos da Patulina na saúde. ....	24
Tabela 3: Estudos realizados em alimentação infantil, relativamente à exposição à patulina através do consumo de maçã.....	26
Tabela 4: Características do método analítico. ....	34
Tabela 5: Condições cromatográficas para a análise de patulina por HPLC-UV. ....	39
Tabela 6: Programa de lavagem e de equilíbrio da coluna entre injeções de amostra. ....	40
Tabela 7: Critérios de aceitação das recuperações e duplicados.....	41
Tabela 8: Participantes do estudo.....	56
Tabela 9: Resultado do consumo alimentar por criança, em termos, de sumos e purés e sumos à base de maçã.....	57
Tabela 10: Teores de patulina determinado nas amostras de sumo e puré à base de maçã.....	60
Tabela 11: Correspondência dos valores da ocorrência com os valores do LOD e LOQ para a avaliação de exposição.....	62
Tabela 12: Concentração média de patulina nos purés e sumos à base de maçã (comercializados em Portugal).....	62
Tabela 13: Estimativa da ingestão de patulina através do consumo de alimentos infantis à base de maçã. Os cenários de exposição derivaram do uso da média, mediana e percentis 90, 95 e 99 da concentração de patulina de todas as amostras de alimentos infantis analisados (n=14). ....	64
Tabela 14: Percentagem de dose diária admissível máxima provisória (DDAMP) para os diferentes cenários de exposição utilizando a média, mediana e percentis de concentrações de patulina. ....	65
Tabela 15 Anexo II: Características das amostras analisadas. ....	79

## **Índice de equações**

Equação 1: Equação para calcular o teor de patulina nas amostras. .... 42

Equação 2: Cálculo da ingestão diária de patulina..... 42

## **Índice de gráficos**

Gráfico 1: Ocorrência de patulina nas amostras de purés e sumos à base de maçã. ...61

## Referências

As referências bibliográficas apresentadas nesta dissertação encontram-se de acordo com o estilo bibliográfico da *Nature*.

A presente dissertação foi escrita ao abrigo do novo acordo ortográfico.

## Lista de abreviaturas / siglas

< - Menor.

> - Maior.

[ ] – Concentração.

**AESA** – Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (EFSA - European Food Safety Authority).

**DAN** - Departamento de Alimentação e Nutrição.

**DD%** - Diferença de duplicados.

**DDAMP** - Dose diária admissível máxima provisória (PMTDI - Provisional maximum tolerable daily intake).

**DSAP** - Dose semanal admissível provisória (PTWI - Provisional Tolerable Weekly Intake).

**EuroFir** - European Food Information Resource Network.

**FAO** - Organização das Nações Unidas para a Agricultura e a Alimentação (Food and Agriculture Organization).

**FDA** - Food and Drug Administration.

**HPLC** - Cromatografia líquida de alta eficiência (High Performance Liquid Chromatography).

**HPLC-UV** - Cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de ultravioleta (High Performance Liquid Chromatography with Ultraviolet Detector).

**IARC** - Agência Internacional para a Investigação em Cancro (International Agency for Research on Cancer).

**IDT** – Ingestão diária tolerável (TDI - Tolerable daily intake).

**INSA** - Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge.

**ISO** - Organização Internacional para Padronização (International Organization for Standardization)

**JECFA** - Comissão conjunta de peritos em aditivos alimentares da FAO/OMS (FAO/WHO Joint Expert Committee on Food Additives of the United Nations).

**Kg** – Quilograma.

**LOD** - Limite de deteção (Limit of Detection).

**LOQ** - Limite de quantificação (Limit of Quantification).

**Max** – Máxima.

**ni** – não identificado.

**NOAEL** - Nível de efeito adverso não observado (No Observed Adverse Effect Level).

**NP EN** – Normas Portuguesas.

**OMS** - Organização Mundial de Saúde.

**OPEN** – Open platform for clinical nutrition.

**P** – Percentil.

**SCOOP** - Cooperação científica sobre questões relacionadas com alimentos (Scientific Cooperation on Questions Relating to Food).

**SPE** - Extração em fase sólida (Solid Phase Extraction).

**SPSS** - Statistical Package for Social Sciences.

**TCA** – Tabela de composição dos alimentos.

**UE** - União Europeia.

**USDA** - Departamento de Agricultura dos Estados Unidos.

# **Capítulo I – Introdução teórica**

## **1.1 Crianças e a alimentação**

A infância representa um período de vida do ser humano no qual ocorrem várias alterações, tal como, anatómicas, fisiológicas, metabólicas, funcionais, toxicocinéticas e toxicodinâmicas.

De acordo com a Diretiva 2006/125/CE, refere-se por lactentes ao grupo de crianças com menos de 12 meses de idade e por crianças jovens, as crianças com idades compreendidas entre 1 e 3 anos<sup>18</sup>. Durante este período (0-3 anos), as crianças estão em constante crescimento e apresentam necessidades nutricionais elevadas, sendo especialmente dependentes dos seus educadores. Além disso, a infância é igualmente considerada um período formativo onde os hábitos e as preferências são estabelecidas, bem como o desenvolvimento e manutenção de comportamentos saudáveis.

Neste capítulo serão avaliadas as características que contribuem para a vulnerabilidade infantil, desde as alterações corporais até à influência da alimentação.

### **1.1.1 Vulnerabilidade infantil**

As crianças constituem um grupo populacional muito vulnerável à exposição por contaminantes diferenciando-se dos adultos, principalmente pelos seus fatores intrínsecos e os extrínsecos.

Durante o desenvolvimento infantil ocorrem alterações intrínsecas, influenciadas significativamente por fatores genéticos, que representam um fator fundamental na determinação da suscetibilidade à exposição diária a contaminantes através de diferentes vias: dérmica, respiratória e alimentar.

As crianças têm uma área de superfície corporal muito superior em relação ao peso corporal, comparativamente à dos adultos. Nesta faixa etária, a epiderme é pouco desenvolvida e possibilita uma elevada absorção percutânea, que por ser naturalmente mais hidratada, possibilita a absorção de alguns produtos químicos hidrófilos de forma mais eficiente<sup>19</sup>.



A exigência de fluidos é maior nos lactentes e crianças jovens do que nos adultos<sup>3</sup> e a sua sensibilidade característica, confere baixa capacidade de desintoxicação<sup>20</sup>.

As crianças caracterizam-se pela sua elevada taxa metabólica, pois necessitam de energia para estimular o crescimento e o desenvolvimento. O aumento da taxa metabólica basal e os requisitos de energia necessários em crianças indicam que o consumo de oxigénio é maior por quilograma de peso corporal. Sendo que o consumo de oxigénio de uma criança com menos de 1 ano de idade é o dobro de um adulto, a exposição aos contaminantes é superior<sup>20,19</sup>.

Após o nascimento, o sistema imunitário da criança não está totalmente desenvolvido, o pode comprometer os seus órgãos-alvo e causar elevada suscetibilidade a certas infeções. O mesmo ocorre com o desenvolvimento e maturação estrutural e funcional do trato gastrointestinal (acidez gástrica, motilidade gastrointestinal, atividade enzimática, flora bacteriana) do sistema endócrino e reprodutivo, do rim e do desenvolvimento motor do lactente, que ocorrem apenas no 6º mês de vida<sup>19</sup>.

Um dos principais fatores extrínsecos que afetam a suscetibilidade à exposição a contaminantes é a alimentação e o contato direto com o meio ambiente. Muitos contaminantes existentes no meio ambiente contaminam a cadeia alimentar. É exemplo, o fato dos lactentes estarem expostos a substâncias químicas através do leite materno, a sua primeira fonte de alimento<sup>19</sup> e através da ingestão indireta, caso a criança manuseie ou consuma alimentos que estiveram em contato com o solo ou outras superfícies contaminadas<sup>21</sup>.

É igualmente relevante, a relação entre o peso corporal e a quantidade de alimento ingerido, uma vez que as crianças consomem mais alimentos e bebidas por quilograma de peso corporal do que os adultos. O baixo peso corporal de uma criança pode torná-lo mais propício a infeções e, em situações mais graves, causar a morte. Esta situação verifica-se sobretudo em países em desenvolvimento, onde os recursos são escassos e as crianças tornam-se extremamente vulneráveis às exposições ambientais.

### 1.1.2 Alimentação infantil

Nos primeiros anos de vida do ser humano, a dieta é um fator crítico para o bom desenvolvimento e crescimento das crianças, razão pela qual tem sido objeto de diversos estudos científicos.

A *Organização Mundial de Saúde* (OMS) recomenda que os lactentes sejam exclusivamente amamentados durante os primeiros seis meses de vida, ou seja, consumam unicamente leite materno e nenhum outro líquido ou sólido à exceção de gotas ou xaropes de vitaminas, suplementos minerais ou fármacos<sup>22</sup>. Posteriormente, de modo a suprir algumas necessidades nutricionais, o aleitamento é misto caso o lactente complete a amamentação com fórmulas infantis ou parcial, se o aleitamento for acompanhado por alimentação complementar.

É consensualmente reconhecido que do ponto de vista da evolução maturativa, o lactente está preparado para o início da diversificação alimentar a partir dos quatro meses de vida. Nesta idade o lactente ganha uma maior estabilidade maxilar e do pescoço e o padrão primitivo de sucção começa a modificar-se. Entre os cinco e os oito meses ocorre uma transição progressiva das funções neuromotoras com a passagem da sucção para a mastigação, desenvolvendo a capacidade de ingerir alimentos nutritivos e sólidos<sup>22</sup>.

O processo de passagem de uma dieta rica em gorduras para a uma dieta rica em hidratos de carbono induz, só por si, adaptações hormonais significativas com repercussões no processo de crescimento e exigências de adaptabilidade digestiva. Assim, quer por exigências nutricionais ou inerentes ao desenvolvimento neurosensorial, motor e social do lactente, a partir dos quatro meses deverá proceder-se à introdução de alimentos de textura progressivamente menos homogênea que o leite e futuramente, a sua inserção na dieta familiar, o que deverá ocorrer a partir dos 12 meses de idade. Os alimentos complementares à amamentação enriquecem a dieta com uma ampla gama de macronutrientes, micronutrientes e energia. Tradicionalmente, um dos primeiros alimentos a ser introduzido era o cereal sob a forma de farinha, contudo, à luz do conhecimento atual, insere-se primeiro o caldo ou puré de legumes (quinto a sexto mês) e depois a fruta<sup>23</sup>. Posteriormente, serão introduzidos progressivamente os alimentos como o cereal, a carne, o peixe, o ovo, as leguminosas e o iogurte até atingir a dieta familiar.

As frutas que podem ser introduzidas na alimentação a partir do sexto mês de vida são importantes fornecedores de vitaminas, minerais e fibras. Os nutrientes adquiridos através de uma dieta rica em fruta contribui para a prevenção do cancro e de doenças cardiovasculares<sup>22</sup>. A maçã, a pera e a banana são habitualmente os primeiros frutos a serem introduzidos na alimentação do lactente.

Apenas cerca de 15% das crianças consomem os níveis recomendados de fruta, tornando-se um grave problema de saúde pública<sup>24</sup>. O consumo de sumo e purés de frutas ajuda a cumprir esta recomendação alimentar, sendo que o consumo de sumo de fruta corresponde a 50% de todas as porções de fruta consumidas por crianças e adolescentes dos dois aos 18 anos, e 1/3 de todas as frutas e vegetais consumidos pelos pré-escolares<sup>25</sup>. Na União Europeia, o consumo de sumos de frutas e néctares varia consideravelmente entre os Estados Membros, dependendo das condições climáticas e de hábitos de consumo, que atingiram em média, 110 mL por dia em 2007<sup>25</sup>.

A comercialização dos produtos destinados à alimentação infantil está de acordo com a Diretiva “Fórmulas para lactentes e fórmulas de transição”<sup>18</sup> e “Alimentos à base de cereais e alimentos infantis destinados a lactentes e crianças jovens”<sup>18</sup>.

## **1.2 O risco alimentar**

A segurança alimentar é uma preocupação constante em saúde pública. Em resposta a um crescente número de surtos alimentares e às preocupações dos consumidores, é primordial aperfeiçoar os programas de monitorização e otimizar os métodos analíticos por forma a garantir a segurança alimentar e, eventualmente, prevenir ou reduzir as doenças transmitidas pelos alimentos.

Neste capítulo serão referidos os princípios necessários para garantir o controlo do risco alimentar e a determinação da exposição a contaminantes.

### **1.2.1 Análise do risco: definições e características**

A análise de risco compreende três passos principais: avaliação do risco, gestão do risco e comunicação do risco. A avaliação do risco define-se como “a avaliação científica e sistemática de potenciais efeitos adversos para a saúde humana, resultantes da exposição a agentes e ou situações perigosas”<sup>26</sup>. Os termos perigo e risco descrevem,

respetivamente, “a propriedade inerente de um agente ou situação que tem o potencial para causar efeitos adversos quando um organismo, sistema ou (sub) população se encontra exposta a esse agente” e “a probabilidade de ocorrer um efeito adverso no organismo, sistema ou (sub) população, causado sob circunstâncias especificadas por exposição a um agente”. A gestão do risco consiste no “processo de gestão das possíveis alternativas com fim de aceitar, minimizar ou reduzir os riscos previamente avaliados e, selecionar e aplicar as medidas adequadas”. Por fim, a comunicação de risco, consiste na “troca de informações e opiniões entre as partes interessadas”<sup>11</sup>.

A fim de determinar os níveis aceitáveis de perigo, as entidades responsáveis devem monitorizar regularmente os produtos alimentares e, na situação de indício de risco efetuar uma avaliação do risco. A avaliação do risco é a componente científica da análise de risco e foi desenvolvida principalmente pela necessidade de tomar decisões para proteger a saúde face à incerteza científica<sup>27</sup>. O risco é determinado pela relação da exposição com o perigo ou toxicidade, por isso é importante ter em conta os níveis e destino do agente, os padrões de consumo e em que circunstância o mesmo atua<sup>28</sup>. A avaliação do risco envolve quatro fases fundamentais: a identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco.

Numa primeira fase, na identificação do perigo, procura-se identificar os efeitos potencialmente negativos ou adversos, independentemente da dose ou mecanismo envolvido, causados por um agente e que provoque esse efeito num organismo, sistema ou população<sup>29,28</sup>.

A caracterização do perigo foca-se na descrição qualitativa e, sempre que possível, quantitativa das propriedades de um agente ou situação com potencial para causar um efeito adverso. Isto deve, sempre que possível, incluir uma avaliação dose-resposta e as suas incertezas<sup>29,28</sup>.

O terceiro passo da avaliação do risco é definido como a avaliação da exposição de um organismo, sistema ou população a um agente. De acordo com a Comissão do *Codex Alimentarius*, a avaliação da exposição aos produtos químicos existentes nos alimentos, pode ser descrita mais especificamente, como a avaliação qualitativa e/ou quantitativa da ingestão provável dos agentes químicos através dos alimentos, bem como a exposição a outras fontes, se for o caso<sup>30</sup>.

Por fim, a caracterização do risco determina os indicadores qualitativos e, sempre que possível, quantitativos, incluindo incertezas, probabilidade de ocorrência e dos potenciais efeitos adversos conhecidos de um agente num dado organismo, sistema ou (sub) população, em condições de exposição definidas. Na caracterização do risco, as informações da avaliação do consumo ou exposição e, da identificação do perigo, são integradas num parecer adequado para a tomada de decisões na gestão de riscos<sup>31</sup>. A caracterização do risco fornece estimativas do risco potencial para a saúde humana sob diferentes cenários de exposição. Deve incluir todos os pressupostos principais e descrever a natureza, relevância e magnitude dos riscos para a saúde humana.

Todo o procedimento executado para efetuar uma avaliação do risco é baseado em estimativas internacionais, referentes particularmente às necessidades nutricionais, exposição a aditivos e contaminantes alimentares<sup>32</sup>. É importante também abordar a análise da toxicidade, direcionada para os “níveis de tolerância” e os “níveis de risco aceitável”<sup>31</sup>, ou seja, o nível de exposição limite que, se excedido, deverá ser reportado e uma ação específica deve ser tomada.

A avaliação da exposição alimentar permite identificar situações em que ocorre o consumo de certos contaminantes em alimentos com teores acima dos limites de segurança estabelecidos na legislação. Na avaliação da exposição é importante estudar as potenciais vias de exposição, baseando-se na ocorrência dessas substâncias em produtos alimentares e em dados de consumo desses mesmos produtos, no país em causa<sup>33</sup>.

A relação existente entre a presença de contaminantes nos alimentos e a avaliação da exposição através da alimentação tem obtido reconhecimento mundial, principalmente com maior interesse para aplicação na monitorização da dieta infantil e posterior relação com as escolhas alimentares e a saúde da criança. Para a realização de um processo de monitorização, tem-se em consideração 3 pontos fundamentais: (1) ocorrência e concentração do contaminante presente no alimento; (2) padrão de consumo da população/consumidor e, (3) tipo de contaminante presente nos alimento.

A avaliação da exposição humana compreende os pontos fundamentais de monitorização, de modo a obter a concentração de contaminante ingerida diariamente. Atualmente, a estimativa da exposição alimentar pode ser determinística ou probabilística. Quando a exposição é calculada através da multiplicação de um valor fixo do consumo com um

valor fixo de concentração no alimento denomina-se por determinística<sup>8</sup> e, os dados são posteriormente disponibilizados para o processo de caracterização de risco. Quando a exposição inclui modelos matemáticos que têm em conta a variabilidade dos alimentos consumidos e do teor dos contaminantes/toxinas nos alimentos, do peso corporal do indivíduo e da variabilidade dos dados de consumo total denomina-se por probabilística<sup>8</sup>.

### **1.2.2 Avaliação de exposição a contaminantes químicos**

A metodologia adotada para avaliar a exposição aos contaminantes químicos através da alimentação deve considerar, principalmente, os indivíduos que consomem grandes quantidades de alimento com a substância ou alimentos com quantidades elevadas do contaminante<sup>33</sup>. Existem vários modelos disponíveis para estimar a exposição aos contaminantes, mas a solução ideal é o método que preveja a percentagem de população que ingere um valor superior ao critério de aceitação, como por exemplo, a ingestão diária tolerável (IDT)<sup>34</sup>.

A IDT de um contaminante consiste na estimativa da ingestão média diária de determinada substância, durante toda a vida sem qualquer efeito adverso sobre a saúde humana<sup>35</sup>. É expressa em micrograma de contaminante por quilograma de peso corporal por dia ( $\mu\text{g/Kg}$  peso corporal/dia).

Com base nos estudos efetuados em animais é estabelecido um limite máximo, o nível de efeito adverso não observado (NOAEL), que corresponde à dose mais elevada testada ou à concentração máxima de uma substância ingerida, em que o efeito adverso não é encontrado. Ao NOAEL é associado um fator de segurança que tem em linha de conta a diferenças entre espécies e a variabilidade da espécie humana, geralmente de 100 (10 vezes para a variabilidade entre espécies e 10 vezes para a variabilidade da espécie humana) resultando no IDT<sup>11</sup>.

Neste sentido, com base no NOAEL e tendo em conta o caso dos contaminantes, os níveis / limites máximos que são estabelecidos para os alimentos, fornecem uma contribuição significativa para a exposição total da dieta. No entanto, é de princípio geral que os níveis dos contaminantes devem ser sempre mantidos tão baixos quanto possível.

### 1.3 Consumo alimentar

As patologias resultantes dos hábitos alimentares refletem-se em qualquer idade, principalmente nas crianças, devido à sua vulnerabilidade. Este fato, tem instigado pesquisadores a procurar os meios mais adequados para avaliar qualitativamente e quantitativamente o consumo de alimentos, dimensionar a adequação de nutrientes e relacionar a dieta à ausência de saúde<sup>36</sup>, fundamentando a elaboração de recomendações e guias alimentares.

A avaliação do consumo alimentar de uma população permite estimar a sua ingestão nutricional e a qualidade dos produtos alimentares consumidos, determinar a ingestão accidental de contaminantes e contribuir para o desenvolvimento de novas políticas alimentares, entre outros. Os dados sobre os padrões de consumo são utilizados pela *Autoridade Europeia para a Segurança Alimentar (AESA)* e outras agências responsáveis, para considerações nutricionais, toxicológicas e estimativas históricas ou tendências seculares.

Na avaliação do consumo alimentar podem ser aplicados diferentes métodos de análise. O método aplicado depende da população a ser estudada e da finalidade do estudo, podendo avaliar a dieta comum (média do consumo num período determinado de meses ou um ano) ou a atual (média do consumo alimentar num curto período de tempo)<sup>37</sup>.

É referido na literatura, a necessidade de se obter informações detalhadas quanto ao consumo dos alimentos na Europa, com a objetivo de melhorar a investigação e a avaliação da exposição, como processo integrante da avaliação de risco efetuada pela AESA<sup>38</sup>.

Os dados de consumo refletem a alimentação que os indivíduos ou grupos da população praticam em termos de alimentos sólidos, bebidas e suplementos. No entanto, o estudo dos consumos alimentares apresenta inúmeros obstáculos, não só pela dieta humana ser aleatória como bastante variável<sup>39,40</sup>. Como é referido por Barbosa *et al.*, “ainda que os indivíduos tenham um padrão estável de consumo não existem elementos consideravelmente consistentes, uma vez que o consumo diário de alimentos é um evento completamente aleatório, justificado por fatores tais como o dia-a-dia, dia da semana e a sazonalidade e, potencializados por aspetos socioeconómicos, culturais e ecológicos”<sup>41</sup>. Estes estudos são igualmente influenciados pela capacidade de memorização do

indivíduo em estudo (entrevistado), as estimativas errôneas do tamanho e frequência das porções consumidas<sup>40</sup>. Tendo em conta as dificuldades destes estudos, a escolha do instrumento mais adequado tem em consideração o objetivo e o plano metodológico do estudo, a população alvo e os recursos disponíveis<sup>42</sup>.

A avaliação de consumo de subgrupos da população, como é o caso das crianças, podem apresentar alguns problemas e/ou limitações na aplicação dos métodos de avaliação e na maioria das situações têm de envolver os seus familiares para um resultado eficiente<sup>43</sup>.

### **1.3.1 Métodos de avaliação do consumo alimentar**

Os instrumentos de avaliação do consumo alimentar a nível individual dividem-se em duas categorias, prospetivo ou retrospectivo. O método prospetivo recolhe informações quanto ao consumo atual, que corresponde ao registo ou diário alimentar. O método retrospectivo obtém informações sobre o consumo num período de tempo anterior, através do questionário às últimas 24 horas ou do de frequência alimentar<sup>44</sup>.

O método prospetivo é o mais comum e envolve a avaliação do consumo dos alimentos no momento em que este é ingerido ou pouco depois<sup>45</sup>. Nos registos ou diários alimentares, o entrevistado regista o seu próprio consumo alimentar em formulários específicos e à medida que o pratica. Estes formulários permitem registar as quantidades de todos os tipos de alimentos e bebidas consumidas ao longo do dia, tendo igualmente em conta tanto as refeições caseiras como as confeccionadas fora de casa. A sua aplicação pode durar entre um e sete dias e ser quantificados através de estimativas (por exemplo, medidas caseiras) ou por pesagens dos alimentos consumidos<sup>46,47</sup>. Também é possível a aplicação de outras técnicas, como a relação entre o alimento ingerido e o que ficou no prato, com recurso a exemplos fotográficos, gravações em vídeo e registos eletrónicos<sup>48</sup>. Uma vez que os diários alimentares são menos dependentes da capacidade de memória do entrevistado estes tendem a ser mais precisos do que os métodos retrospectivos. No entanto, as suas limitações advêm da possível tendência de influenciar o entrevistado nas escolhas alimentares, ou seja, induzir o entrevistado a alterar o consumo durante o período de observação<sup>45</sup>. É aplicado com frequência em estudos ou situações clínicas que requerem estimativas do consumo alimentar<sup>49</sup> ou da ingestão de nutrientes.



O método retrospectivo permite a avaliação do consumo alimentar de determinado período de tempo específico através da recordatória<sup>45</sup>. A entrevista pode ser realizada pessoalmente ou por telefone ou, em alternativa, o inquirido preenche sozinho o inquérito em papel ou via computador<sup>10</sup>. Portanto, este método depende fundamentalmente da memória e, por conseguinte, é limitado pela capacidade do indivíduo recordar o que consumiu num passado próximo ou mais distante. É importante que o entrevistador seja hábil e consiga obter os dados próximos ou mesmo iguais aos reais. São exemplos deste método retrospectivo as últimas 24 horas e o questionário de frequência alimentar.

De acordo com as metodologias gerais referidas anteriormente, são descritos em seguida os métodos de avaliação de consumo alimentar:

- a) O diário alimentar consiste no registo dos alimentos consumidos, de uma forma individual, incluindo os métodos de preparação dos alimentos e as marcas, durante um período de tempo específico (um, três ou sete dias). É efetuado pelo próprio indivíduo mas envolve devida instrução por parte de um profissional, que deve incluir explicação da investigação em causa e instruções especiais quanto à pesagem, quantidade consumida e métodos de confeção. Pode ser uma ferramenta preparada virtualmente (computador) com uma listagem de alimentos, de forma a facilitar o registo, efetuado logo após a refeição para que não haja falhas ou esquecimentos. A quantificação dos alimentos consumidos deverá ser praticada através da pesagem ou pela determinação do volume através de medidas caseiras, como copos, chávenas, colheres padrão<sup>50</sup>, ou pelos valores apresentados na rotulagem<sup>38</sup>. Os dados alimentares devem ser cuidadosamente revistos por um profissional de saúde competente imediatamente após a conclusão do mesmo, a fim de assegurar um nível de descrição minucioso<sup>50</sup>.

Esta abordagem é muitas vezes aplicada como modelo de validação a outros métodos de estudo alimentar e é considerada pela AESA como um método vantajoso para avaliação da exposição aguda<sup>38</sup>. É benéfico por não depender maioritariamente de um profissional de saúde, possuir precisão nos dados, apresentar um meio de armazenamento por um longo período de tempo e por ter baixo custo de aplicação<sup>51</sup>. Contudo, o diário alimentar requer disponibilidade para incluir diariamente os alimentos ingeridos e para que seja representativo do consumo habitual deve ser aplicado conjuntamente com técnicas estatísticas.

- b) As últimas 24 horas é o método mais fácil e rápido para avaliar consumo de alimentos e nutrientes<sup>45</sup>. Permite a recolha de informação sobre todos os itens alimentares consumidos no dia anterior (24 horas), com especificações quanto às porções<sup>52</sup>. É um instrumento que envolve entrevista, não exige vasto conhecimento e responsabilidade por parte do entrevistado. Porém, é fundamental que haja motivação para responder com precisão e, capacidade de percepção para comparar os alimentos ingeridos com modelos alimentares pré-existentes, caso seja necessário. Tradicionalmente, o método envolve entrevista pessoal, contudo as mesmas realizadas via telefone têm sido aplicadas com maior frequência e são consideradas como alternativa viável e por custo reduzido<sup>38</sup>. É essencial que o entrevistado tenha perfeita lembrança do que consumiu e as suas porções, uma vez que tem tendência a minimizar as escolhas alimentares caso perceba que é menos saudável ou aceitável e, exagerar nos que considera saudáveis<sup>45,53</sup>.

Portanto, este método é mais rentável quando a amostra é extensa e a dieta é relativamente monótona<sup>54</sup>. Caso este método seja para estimar a ingestão de alimentos de forma individual, a AESA recomenda a sua aplicação em dois dias não consecutivos<sup>38</sup>.

- c) O questionário de frequência alimentar é considerado o método mais informativo e tem aplicação importante em estudos epidemiológicos que relacionam a dieta com a ocorrência de doenças crônicas<sup>55</sup>. Consiste num questionário contendo uma lista de alimentos para a qual os inquiridos têm que estimar a frequência habitual de consumo durante um período de tempo específico<sup>56</sup>. Pode ser aplicado num período de meses a um ano, com registos em unidades de tempo (dias, semanas ou anos). A lista de alimentos deve ser desenvolvida atendendo a cultura alimentar do país em questão e deve representar dados de confiança<sup>57</sup>.

É um método vantajoso quanto à classificação dos indivíduos e permite a comparação entre dietas ricas e/ou pobres nutricionalmente<sup>56</sup>. Este método apresenta as vantagens de ser um questionário padronizado, ser facilmente automatizado e poder ser utilizado diretamente pelo inquirido, não apresentar elevados custos e não influenciar o comportamento alimentar<sup>38</sup>. Os pontos fracos deste método incluem a necessidade de utilizar a memória, uma tarefa cognitiva difícil para o entrevistado, a imprecisão da quantificação dos alimentos consumidos e do tempo de avaliação, o elevado nível de agregação dos alimentos,

a lista de alimentos pouco evoluída e a influência dos consumos atuais nos consumos anteriores<sup>38,56</sup>. Para o profissional que avalia os questionários, os cálculos de ingestão são complexos e por vezes incertos.

Portanto, como a metodologia é aplicada com recurso a padrões de consumo anteriores, os dados não poderão ser utilizados para avaliação de risco considerável e o nível máximo de dados obtidos é limitada, o que torna o método inadequado para avaliação principal da dieta. Apenas poderá funcionar como abordagem adicional a outros métodos de curto prazo<sup>38</sup>.

Após a recolha dos dados de consumo de alimentos, é estimado a ingestão de nutrientes, quer informalmente através de guias alimentares ou formalmente utilizando tabelas de composição de alimentos que é comparada com regulamentos, recomendações ou diretrizes.

### **1.3.2 Avaliação do consumo alimentar em crianças**

A avaliação do consumo alimentar em crianças é essencial para avaliação do estado nutricional, da exposição a perigos, assim como, para a realização de pesquisas epidemiológicas e pediátricas.

Os primeiros estudos efetuados sobre o consumo alimentar de crianças abordavam apenas a avaliação da ingestão de nutrientes e valores energéticos, sendo o principal objetivo dos investigadores determinar as necessidades alimentares das crianças. Já em 1882, Hasse determinou os consumos de crianças suíças e russas com idades compreendidas entre os dois e os onze anos. As refeições foram pesadas e registadas em três e seis dias<sup>58</sup>.

Hoje em dia, a avaliação do consumo alimentar não se relaciona apenas com questões nutricionais, mas também, com a avaliação da exposição das crianças aos perigos alimentares.

De acordo com a AESA, os lactentes e as crianças jovens são os grupos populacionais com maior prioridade no processo de avaliação da exposição. Contudo, dependendo da idade e do desenvolvimento cognitivo, as crianças podem apresentar limitações de memória, de capacidade para descrever corretamente o que consumiram, assim como, não terem conhecimento suficiente quanto aos tipos de alimentos. Neste caso, as

informações complementares deverão ser fornecidas pelos pais ou encarregados de educação.

Um dos determinantes mais significativos dos hábitos alimentares em crianças são os fatores familiares e a natureza dos alimentos disponíveis em casa, nas escolas ou estabelecimentos que frequentem. Neste contexto, os padrões de consumo alimentar são estruturalmente e culturalmente diferentes durante a semana e fins-de-semana.

Atualmente, de acordo com os métodos de avaliação do consumo alimentar, reconhece-se que o questionário às últimas 24 horas pode ser utilizado pela criança caso tenha idade igual ou superior a dez anos, caso contrário necessita de um adulto e será descrito conforme a observação dos mesmos. Neste caso, a informação pode não ser exata. Já a aplicação do questionário de frequência alimentar depende da capacidade de leitura e escrita da criança, implicando que esta tenha aproximadamente 12 anos<sup>56</sup>. Livingstone *et al.* refere no seu estudo que o diário alimentar seria a melhor opção em crianças, mesmo que envolva a colaboração de um adulto<sup>59</sup>.

De acordo com os documentos disponibilizados pela AESA<sup>38</sup>, é recomendada a aplicação de um diário alimentar como método de análise de ingestão alimentar, abrangendo principalmente dois dias não consecutivos em crianças até aos dez anos de idade. O presente método possibilita a combinação da informação retida através dos pais e/ou profissionais escolares, dependendo da localização da criança. Contudo, são poucos os estudos existentes na literatura que abordem os registos em crianças<sup>49</sup>, dificultando um ponto de comparação para futuras investigações.

## **1.4 Micotoxinas**

No âmbito dos diferentes perigos alimentares, incluem-se fatores com grande impacto devido à gravidade da sintomatologia, como por exemplo, a ocorrência de desequilíbrios nutricionais ou toxinfecções alimentares e perigos com menor impacto, provocados pela presença de contaminantes nos alimentos, tais como as micotoxinas<sup>8</sup>.

As micotoxinas são metabolitos secundários produzidos por fungos, que provocam efeitos tóxicos, mutagénicos, teratogénicos, cancerígenos e efeitos estrogénicos nos humanos e em animais. A *Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura* (FAO) refere que, por ano, cerca de 25% dos alimentos estão contaminados por micotoxinas<sup>60</sup>,

principalmente os cereais, frutos secos, especiarias e algumas frutas, causando graves riscos para a saúde humana e animal<sup>61</sup>.

O termo micotoxina surge da combinação da palavra grega “Mykes” que significa fungo, com “toxicum”, termo latim para toxina<sup>62</sup> e foi aplicado pela primeira vez no início da década de 60 em Inglaterra após a morte de mais de 10 mil perus, que mais tarde se confirmou terem ingerido rações alimentares contaminadas com a micotoxina aflatoxina<sup>63</sup>. Atualmente conhece-se mais de 500 géneros de micotoxinas<sup>64</sup>.

Os fungos produtores de micotoxinas com efeitos mais preocupantes na saúde humana são os do género *Fusarium*, *Aspergillus* e *Penicillium*. A contaminação pode ocorrer durante o crescimento, a colheita, o transporte, o armazenamento e/ou o processamento dos produtos. As espécies *Aspergillus* e *Penicillium* encontram-se normalmente associadas à contaminação durante o armazenamento, enquanto a espécie *Fusarium* pode produzir micotoxinas antes ou logo após a colheita<sup>65</sup>.

As doenças provocadas pela presença de micotoxinas por via alimentar, respiratória ou dérmica, designam-se por “micotoxicoses” e, a sua gravidade depende do tipo de micotoxina, da duração e da dose de exposição, da idade, do estado nutricional e da saúde do indivíduo afetado<sup>66</sup>. A exposição via alimentar pode ocorrer de forma direta, caso haja ingestão de um alimento contaminado (principalmente de origem vegetal), ou de forma indireta, caso o produto alimentar consumido contenha um constituinte previamente contaminado (principalmente alimentos de origem animal)<sup>67</sup>.

As micotoxicoses podem ser classificadas de acordo com o seu grau de toxicidade, em agudas quando surgem de forma rápida e estão associadas à presença de níveis elevados de micotoxinas nos alimentos e em crónicas quando ocorrem por exposição a doses reduzidas de toxina durante um longo período de tempo, podendo daí resultar efeitos graves para a saúde<sup>68</sup>. A toxicidade das micotoxinas é classificada pela *Agência Internacional para a Investigação em Cancro* (IARC), de acordo com o seu grau de carcinogenicidade, em diferentes grupos<sup>8</sup>:

- Grupo 1: carcinogénica para humanos;
- Grupo 2: (A) provável carcinogénico para humanos; (B) possível carcinogénico para humanos;
- Grupo 3: não classificável quando à carcinogenicidade em humanos.

A presença de fungos toxigênicos não é sinónimo de produção de micotoxina, contudo só a presença de um fungo implica um potencial risco para a saúde<sup>69</sup>. Também é de considerar a exposição simultânea a várias micotoxinas e os eventuais efeitos tóxicos combinados daí resultantes. Diversos géneros alimentícios podem conter misturas de micotoxinas, produzidas pela mesma espécie ou por espécies de fungos diferentes. As combinações de micotoxinas que ocorrem frequentemente são: Ocratoxina A e Citrinina, Ocratoxina A e Zearalenona, Ocratoxina A e Aflotoxina B<sub>1</sub>, Patulina e Citrinina, entre outras<sup>70</sup>.

A contaminação dos alimentos pode ocorrer numa variedade de produtos alimentares (principalmente de origem agrícola). A influência de fatores ambientais e biológicos favoráveis tais como, a composição do substrato, a temperatura, a humidade, o pH, a competição microbiana e os danos causados por insetos têm uma grande influência no crescimento de determinados fungos e consequentemente, resultam na contaminação dos alimentos com micotoxinas<sup>71</sup>.

Especialmente, os fatores ambientais e biológicos, tais como atividade de água, temperatura, humidade e danos causados por insetos podem ter uma grande influência sobre o crescimento de determinados fungos e, portanto, sobre o espectro de metabólitos secundários produzidos. É exemplo, o estudo realizado por Serrano *et al.*, que demonstra a influência da temperatura, humidade e teor de oxigénio, dando o exemplo da sazonalidade da área do Mediterrâneo, cujo clima é caracterizado pela alta humidade e temperaturas favoráveis à ocorrência natural de micotoxinas<sup>72</sup>.

As avaliações internacionais realizadas pela Comissão conjunta de peritos em aditivos alimentares da FAO/OMS (JECFA) e, pela AESA, relativamente a dados de contaminação e avaliação da exposição para certas micotoxinas, concluíram que nem todos os países têm dados disponíveis sobre as ocorrências de contaminações alimentares, nem da sua relação com as condições climatéricas ou práticas agrícolas específicas<sup>71</sup>. Sabe-se que a exposição às micotoxinas é mais frequente em zonas menos desenvolvidas, com défices no manuseamento e armazenamento dos alimentos, problemas de subnutrição e ausência de regulamentos. Também alguns tipos de dieta (por exemplo, do Médio Oriente) são mais propícios à exposição a micotoxinas<sup>19</sup>, o que denota a importância do impacto dos limites regulatórios nacionais sobre a exposição total de micotoxinas.

Devido à gravidade do efeito das micotoxinas na saúde humana e animal, a União Europeia (UE) tem elaborado legislação específica e programas de controlo estabelecendo os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios incluindo as micotoxinas, assim como, sobre as determinações analíticas, tais como:

- O Regulamento (CE) N.º 1831/2003 da Comissão de 19 de Dezembro de 2003 que fixa os teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios <sup>73</sup>.
- O Regulamento (CE) 401/ 2006 de 23 de Fevereiro que estabelece os métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios<sup>74</sup>.
- A Diretiva 2006/125/CE da Comissão de 5 de Dezembro de 2006, relativa aos alimentos à base de cereais e aos alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças Jovens<sup>18</sup>.

Atualmente cerca de 100 países no mundo têm legislação ou recomendações relativas aos teores máximos de micotoxinas em alimentação humana e animal<sup>75</sup>.

O presente capítulo explica com brevidade a ocorrência, a caracterização, a toxicidade e os efeitos na saúde das principais micotoxinas e será efetuada uma abordagem mais detalhada da micotoxina em estudo, a patulina.

### **1.4.1 Caracterização dos grupos de micotoxinas: Ocorrência e toxicidade**

A contaminação dos alimentos é essencialmente uma questão de saúde pública, uma vez que provoca efeitos graves na saúde humana e animal. As micotoxinas podem ser classificadas de diferentes modos. Relativamente à sua carcinogenicidade, podem ser diferenciadas de acordo com as suas propriedades carcinogénicas, como:

- Aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> pertencem ao grupo 1<sup>61,15</sup>;
- Aflatoxina M<sub>1</sub>, Fumonisinhas e Ocratoxina A, pertencem ao grupo 2B <sup>8</sup>;
- Tricotecenos, Zearalenona, Citrinina e Patulina<sup>15</sup> pertencem ao grupo 3<sup>61</sup>.

Relativamente aos géneros de fungos produtores, podem ser divididas em diferentes grupos: os produzidos pelo género *Aspergillus* (Aflatoxinas, Ocratoxina A e Citrinina), *Fusarium* (Fumonisinias, Tricotecenos e Zearalenona) e *Penicillium* (Ocratoxina A, Patulina e Citrinina), conforme se ilustra na tabela 1<sup>76</sup>.

**Tabela 1:** Toxinas produzidas por diferentes géneros de fungos.

Géneros		
Aspergillus	Fusarium	Penicillium
Micotoxinas resultantes		
Aflatoxinas (AFs)	Fumonisinias	Ocratoxina A (OTA)
Ocratoxina A (OTA)	Tricotecenos	Patulina (PAT)
Citrinina	Zearalenona (ZEA)	Citrinina

#### 1.4.1.1 Aflatoxinas

As **aflatoxinas** são estruturalmente semelhantes e produzidas pelo género *Aspergillus*, principalmente as espécies *Aspergillus flavus* e *Aspergillus parasiticus*<sup>77</sup>.

Para o ser humano, apenas as aflatoxinas B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> são metabolitos tóxicos. São classificadas de acordo com a cor da sua fluorescência azul (blue) e verde (green) quando irradiadas com irradiação UV<sup>78</sup> e com base na sua mobilidade relativa em cromatografia em camada fina.

Ocorrem como contaminantes naturais dos produtos agrícolas, em condições de temperatura e humidade elevadas<sup>15,79</sup>, portanto é expectável que as maiores concentrações ocorram em alimentos produzidos e armazenados nas regiões mais quentes e húmidas.

A sua incidência em alimentos é maior em anos de seca, devido à fragilidade das plantas e suscetibilidade do ambiente e, são encontradas em países onde as populações têm pouco acesso aos alimentos ou a regulamentação para controlo de qualidade alimentar é reduzida. São razoavelmente estáveis e resistentes aos métodos de confeção alimentar e ocorrem principalmente no milho, trigo, arroz, sorgo, amendoins, figos e nozes<sup>77</sup>.



As intoxicações por aflatoxinas podem provocar cancro hepático primário, icterícia, hepatite crónica, cirrose, hepatomegalia<sup>15</sup> e, em casos mais graves, pode até causar a morte. A aflatoxina B<sub>1</sub> é o metabolito com maior potencial cancerígeno, teratogénico e mutagénico<sup>80</sup> que se conhece.

Em 1994, o “*Scientific Committe for Food*” evidenciou o potencial efeito carcinogénico genotóxico das aflatoxinas, reportando que não existe para esta toxina, um limiar abaixo do qual não se observa efeitos nocivos, não se estabelecendo por isso uma IDT para este grupo de compostos<sup>29</sup>.

De acordo com o regulamento (CE) N.º 1881/2006, a Comunidade Europeia estabeleceu o teor máximo para aflatoxinas de 0,025 µg/Kg para fórmulas destinadas a lactentes e fórmulas de transição, incluindo leite para bebés e leite de transição. Para os restantes géneros alimentícios os teores máximos para aflatoxinas estão compreendidos entre 4 e 15 µg/Kg<sup>73</sup>.

#### 1.4.1.2 Fumonisinhas

As **fumonisinas** são um grupo de micotoxinas produzidas pelo género *Fusarium*<sup>81</sup>, principalmente as espécies *Fusarium verticillioides* (espécie conotada com climas tropicais e subtropicais) e *Fusarium proliferatum*<sup>15</sup>. Existem cerca de 15 fumonisinas diferentes, cujo grupo principal é do tipo B (B<sub>1</sub> e B<sub>2</sub>), sendo a fumonisina B<sub>1</sub> (FB<sub>1</sub>) a mais tóxica e comum nos produtos alimentares (principalmente no milho).

A fumonisina B<sub>1</sub> é estável na maioria dos processos aplicados industrialmente e ambas as estirpes já foram isoladas a partir de culturas de milho e sorgo<sup>64</sup>. A sua ingestão pode causar leucoencefalomalácia, edema pulmonar, efeitos hepatotóxicos e carcinogénicos em animais e, em humanos existe uma ligação provável com a incidência de cancro no esófago. Em certas regiões da África do Sul, da China e do norte de Itália a ocorrência de fumonisina B<sub>1</sub> está correlacionada com a ocorrência de uma elevada incidência de cancro do esófago<sup>15</sup>. Apresenta também a capacidade de atuar sinergicamente com as aflatoxinas e desoxinivalenol. É caracterizada principalmente pela sua capacidade nefrotóxica.

De acordo com o regulamento (CE) N.º 1881/2006, a Comunidade Europeia estabeleceu o teor máximo para fumonisina de 200 µg/Kg para alimentos transformados à base de milho e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens.<sup>79</sup>

#### 1.4.1.3 Tricotecenos

Os **tricotecenos** provêm de diversos gêneros de fungos (*Mycothecium*, *Phomosis*, *Stachybotrys*, *Trichoderma*, entre outros), especialmente do gênero *Fusarium*<sup>15</sup>. A contaminação ocorre principalmente em produtos à base de cereais, em particular de trigo e milho<sup>15</sup>.

Embora haja referência a mais de 150 tricotecenos, as espécies mais problemáticas para a saúde humana são a toxina T-2, a diacetoxiscirpenol (DAS), o desoxinivalenol (DON) e o nivalenol (NIV)<sup>15</sup>. O desoxinivalenol, também designado por 'vomitoxina', é um dos tricotecenos mais estudados devido à sua toxicidade e ocorrência em alimentos, podendo causar perturbações digestivas<sup>20</sup>. Por outro lado, supõe-se que as toxinas T-2 e a diacetoxiscirpenol, são responsáveis pela doença humana aleuquia tóxica, caracterizada por hemorragias, inflamações, distúrbios do Sistema Nervoso Central e dermatites<sup>82</sup>.

Em geral, conferem perturbações gastrointestinais, dermatotóxicas, imunotóxicas, hematotóxicas e genotóxicas<sup>29</sup>.

De acordo com o regulamento (CE) N.º 1881/2006, a Comunidade Europeia estabeleceu o teor máximo para desoxinivalenol de 200 µg/Kg para alimentos transformados à base de cereais e alimentos para bebés destinados a lactentes e crianças jovens. Os restantes gêneros alimentícios apresentam valores limites entre os 500 µg/Kg e 1250 µg/Kg<sup>73,83</sup>.

#### 1.4.1.4 Zearalenona

A **zearalenona** é produzida por espécies de fungos do gênero *Fusarium*, sobretudo as espécies *F. graminearum* e *F. culmorum* e é frequentemente encontrada em produtos alimentares que contenham milho. Castillo sugere que a sua presença em elevadas quantidades nos alimentos deve-se às más práticas de armazenamento, referindo também a capacidade de resistência a temperaturas frias<sup>76</sup>.

É um composto estável, agregado a um forte efeito estrogénico. Tem sido associado a problemas reprodutivos nos animais, uma vez que se liga a recetores de estrogénio<sup>83</sup> e causa situações de hiperestrogenismo, provocando problemas de fertilidade, aborto espontâneo, entre outros. Apresenta também propriedades hematotóxicas e genotóxicas. Comparativamente a outras micotoxinas ostenta baixa prevalência e toxicidade reduzida<sup>15</sup>. A associação entre a exposição de zearalenona e a doença em humanos, é

apenas uma teoria científica com base na observação de puberdade precoce em crianças de Porto Rico, cuja alimentação é à base de alimentos contendo milho<sup>15</sup>.

De acordo com o regulamento (CE) N.º 1831/2003, a Comunidade Europeia estabeleceu o teor máximo para Zearalenona de 20 µg/Kg para alimentos transformados à base de milho destinados a lactentes e crianças jovens. Os restantes géneros alimentícios apresentam valores entre os 50 µg/Kg e os 200 µg/Kg<sup>73, 8</sup>.

#### **1.4.1.5 Citrinina**

A **citrinina** é produzida por várias espécies do género *Penicillium* e *Aspergillus*<sup>8</sup>. Ocorre principalmente no arroz e outros cereais, tais como cevada, trigo, centeio e aveia<sup>15</sup>. No entanto a bibliografia existente apenas a refere como responsável por efeitos tóxicos distintos em animais, como nefrotoxina<sup>15</sup>.

#### **1.4.1.6 Ocratoxina A**

A **ocratoxina A**, produzida por *Aspergillus ochraceus* (climas quentes) e por espécies do género *Penicillium* (climas frios), é uma micotoxina natural de biodeterioração<sup>15</sup>. Dentro das toxinas produzidas pelas espécies do género *Aspergillus*, apenas a ocratoxina A é potencialmente tão preocupante como as aflatoxinas devido aos seus efeitos possivelmente carcinogénicos<sup>15</sup>.

Ocorrem de forma generalizada (cevada, vinho, café) e desenvolvem-se numa ampla gama de condições e, principalmente em alimentos ricos em amido<sup>84</sup>. É bastante comum em cereais, sendo que 50% do consumo diário desta micotoxina provem de produtos à base de cereais e seus constituintes (como nozes e passas). É um metabolito estável, que não se destrói completamente durante o processamento nem confeção dos alimentos<sup>85</sup>.

Os seus efeitos tóxicos incluem nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, imunossupressão e teratogenicidade<sup>29</sup>. Após a sua ingestão, acumula-se no sistema circulatório e noutros tecidos, atuando como um imunossupressor e inibindo a síntese proteica. A sua estabilidade no sistema circulatório faz com que a ocratoxina A se acumule nos tecidos dos animais e possa posteriormente progredir na cadeia alimentar até aos humanos<sup>83</sup>.

É frequentemente associada à doença crónica renal nos humanos, especificamente designada por “Nefropatia endémica dos Balcãs”. A doença afeta a população da

Bulgária, Roménia e Jugoslávia, através da existência de transportadores específicos envolvidos na captação da toxina e acumulação no rim. No Homem, a toxina tem um tempo de semi-vida de 35 dias<sup>8</sup>.

De acordo com o regulamento (CE) N.º 1831/2003, a Comunidade Europeia estabeleceu o teor máximo para Ocratoxina A de 0,5 µg/Kg para alimentos transformados à base de milho destinados a lactentes e crianças jovens. Os restantes géneros alimentícios apresentam valores limites entre os 2 µg/Kg e 10 µg/Kg<sup>73, 86</sup>.

## 1.5 Patulina

### 1.5.1 Definição e ocorrência

A patulina (PAT) surgiu em 1940 após a descoberta da penicilina, tendo sido utilizada como spray nasal para tratamento de constipações e como pomada para tratamento antifúngico da pele. Foi isolada a partir do fungo *Penicillium griseofulvum* e caracterizada como um potencial antibiótico antifúngico de largo espectro<sup>87</sup>. Contudo, na década de 60, após estudos em animais e plantas, verificou-se que a sua aplicação produzia efeitos tóxicos graves, pelo que ao seu uso na medicina foi abandonado e integrou-se no grupo das micotoxinas<sup>15,87</sup>. Inicialmente, foi reconhecida por inúmeras designações tais como clavacina, claviformina, clavatina, ácido gigante, expansina ou miocina C.

Esta micotoxina é produzida por mais de 60 espécies de fungos dos géneros *Penicillium*, *Aspergillus* e *Byssochylamys*, e possui capacidade de se desenvolver numa grande diversidade de produtos<sup>15</sup>.

O género *Penicillium* é o fungo mais encontrado nos alimentos, principalmente a espécie *Penicillium expansum*, que causa o apodrecimento da fruta e a formação de bolor de cor azul<sup>88</sup>. Esta espécie é caracterizada como um fungo psicotrófico, comum em maçãs, pêssegos e peras e responsável por 70 a 80% da deterioração das frutas armazenadas, uma vez que se desenvolve até a temperaturas menores que 5°C<sup>89</sup>. O género *Aspergillus* é frequentemente encontrado em forragens para animais e o género *Byssochylamys* é o principal responsável pela deterioração dos frutos processados<sup>90</sup>.

A fruta é o alimento com maior risco para a ocorrência de patulina, sobretudo as maçãs e produtos derivados, devido à sua suscetibilidade e devido a ser um bom substrato. Os sumos ou os derivados de maçã são por vezes produzidos, a partir de algumas frutas que

não apresentam o padrão exigido para a venda em grandes estabelecimentos, mas por apresentarem por exemplo, picadas de insetos, evidências na epiderme, fruto deformado e problemas fitossanitários. As frutas apresentam neste caso, marcas de deterioração que poderão indicar presença de micotoxina<sup>89</sup>. A produção de patulina pelo fungo ocorre nas partes danificadas do fruto, difundindo-se cerca de 1 cm a partir da área do bolor. A figura 1 apresenta uma fotografia de maçãs contaminadas com bolor<sup>91</sup>.



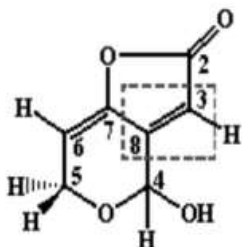
**Figura 1:** Maçãs contaminadas com bolor.

De acordo com um estudo efetuado pelo Departamento de Agricultura dos Estados Unidos (USDA), as crianças consomem quantidades elevadas de produtos contendo maçã durante o primeiro ano de vida (6,4 g/Kg peso corporal/dia), comparativamente com os adultos (1 g/Kg peso corporal/dia), o que aumenta assim o risco de exposição à patulina<sup>87</sup>.

Assim sendo, a *Food and Drug Administration* (FDA) elaborou um documento visando o estudo da segurança alimentar da patulina, com a finalidade de avaliar os teores deste contaminante em sumos de maçã e posterior identificação de um limite legal para a sua ingestão. Neste estudo verificou-se que a patulina não é detetada em bebidas alcoólicas a partir de frutas devido à fermentação, contudo, nos sumos de maçã, o processamento térmico não é suficiente para eliminar a patulina, reduzindo apenas o seu teor e ocorrendo no produto final<sup>92</sup>.

### 1.5.2 Propriedades químicas e físicas

A patulina (figura 2) é designada quimicamente por 4-hidróxi-4Hfuro[3,2-c]piran-2(6H)-ona, com a fórmula molecular de  $C_2H_6O_4$  caracterizada como uma lactona heterocíclica insaturada<sup>90</sup>. Apresenta peso molecular de 154,12 Da.



**Figura 2:** Estrutura molecular da patulina.

É um composto cristalino incolor com ponto de fusão de 110°C, estável em ácidos diluídos e resistente às temperaturas altas com pH entre 3,5 e 5,5. Apresenta absorvância máxima aos 276 nm ( $\epsilon = 14,450$ , em etanol)<sup>95</sup>. É solúvel em água, acetona, etanol, clorofórmio e éter etílico e insolúvel em benzeno e éter de petróleo. Tende a degradar-se gradualmente se armazenada na presença de sulfitos, grupos sulfidrílo e ácido ascórbico.

### 1.5.3 Efeito na saúde – toxicidade

Com a finalidade de avaliar a exposição humana à patulina é importante identificar a quantidade presente nos alimentos consumidos e destinados às diferentes faixas etárias. Desta forma, e tendo em conta que a patulina tem capacidade de inibir o desenvolvimento de inúmeras bactérias, tanto bactérias gram-positivas como gram-negativas, efetuaram-se inúmeros estudos clínicos de toxicidade<sup>87</sup>.

A patulina foi avaliada pela IARC em 1986 como um carcinogénico do grupo 3, isto é “não classificável quanto à sua carcinogenicidade em humanos”<sup>15</sup>, contudo, ao longo dos anos têm surgido alguns estudos que tentam refutar esta classificação. De acordo com estudos recentes de toxicidade em animais, a patulina confere diversos efeitos nocivos, desde a implicação na saúde ao nível agudo (em ratinhos), crónico (efeitos mutagénicos e imunossupressores em ratinhos e coelhos) e celular, como é exemplificado na tabela 2<sup>87</sup>. Ensaio efetuados em animais demonstraram que a patulina tem um grande espectro de

toxicidade, não só é considerada bactericida e fungicida, como em concentrações de 0,3-2,5 mg/g pode provocar morte imediata (causada por edema cerebral e hemorragias nos pulmões).

**Tabela 2:** Efeitos da Patulina na saúde.

<b>Efeito agudo</b>	Agitação, convulsões, dispneia, congestão pulmonar, edema, hiperemia, distensão do trato gastrointestinal, náuseas, degeneração das células epiteliais, hemorragia intestinal, inflamação intestinal, ulceração.
<b>Efeito crónico</b>	Genotoxicidade neurotoxicidade, imunotoxicidade, imunossupressão, teratogenicidade, carcinogenicidade.
<b>Efeito ao nível celular</b>	Rutura da membrana plasmática, inibição da síntese de proteína, alteração na transcrição e tradução, inibição da síntese de ADN, inibição da urease, perda de glutathione livre, entre outros.

Em 2004, Rychlik *et al.* efetuaram um estudo *in vitro* e *in vivo* com a finalidade de analisar o processo metabólico da patulina. Embora a patulina estivesse presente em concentrações elevadas, verificou-se que podia ser degradada durante o seu percurso pelo sistema gastrointestinal ou até mesmo, desaparecer rapidamente após o contato com o sangue total. Este estudo concluiu que a patulina não apresentava efeitos sistémicos e que a sua ação tóxica atuava essencialmente a nível local<sup>94</sup>.

Em Portugal existem poucos estudos com base na ocorrência de patulina nos alimentos e apenas uma publicação refere os dados da ocorrência em alimentação infantil. Neste estudo, Barreira *et al.* referem que das 68 amostras de sumo de maçã e 76 amostras de puré de fruta à base de maçã analisadas, 41% e 7% das amostras, respetivamente, apresentavam patulina em concentrações superiores ao limite de deteção<sup>16</sup>. No entanto, mesmo com valores máximos de 42 µg/Kg nos sumos de maçã e 5,7 µg/Kg nos purés de

fruta à base de maçã, os teores eram inferiores ao valor limite regulamentado para este tipo de géneros alimentícios.

Paul Gibbs *et al.* publicou um estudo que envolveu a análise de 36 amostras de sumo de maçã e pera<sup>95</sup>. Nas oito amostras contendo sumo 100% maçã turva, detetou patulina em 88% das amostras com concentração média de 10,5 µg/L e máxima de 25,2 µg/L e, em sete amostras de sumo 100% maçã límpido não detetou teores de patulina.

Os limites máximos para a patulina nos alimentos têm sofrido alterações ao longo dos anos. Inicialmente, foi estabelecido pela JECFA um valor da dose semanal admissível provisória (DSAP) em 7 µg/Kg por peso corporal/semana<sup>8</sup>. Em meados de 1995, uma nova avaliação determinou o valor de 0,43 µg/Kg de peso corporal/dia como a dose diária admissível máxima provisória (DDAMP). Recentemente, estabeleceu-se o valor de 0,43 µg/Kg de peso corporal/dia<sup>92</sup>.

Em produtos à base de maçã destinados à alimentação infantil encontra-se estabelecido pela UE o valor limite para patulina de 10 µg/Kg<sup>73</sup>.

#### **1.5.4 Avaliação de exposição em alimentos com patulina**

A avaliação da exposição às micotoxinas depende não só do nível destas substâncias nos alimentos, como do consumo desses alimentos pelos indivíduos, podendo diferir por regiões do país ou culturas.

Em 2003, foi realizado pela Cooperação científica sobre questões relacionadas com alimentos (SCOOP), um estudo para avaliar a exposição à patulina através da avaliação da ingestão alimentar de patulina aplicado às populações dos Estados Membros da União Europeia. Cada País efetuou uma estimativa de ingestão de patulina por alimento (sumos de maçã, uva, pera, entre outros e purés de maçã)<sup>96</sup>. Os resultados obtidos evidenciaram a escassa informação quanto aos consumos da população infantil e, que apenas 2,4% das amostras apresentavam teores superiores a 50 µg/Kg, indicando que os produtos que circulam na UE apresentam uma boa qualidade sanitária em relação à contaminação com patulina. Em Portugal, verificou-se que o sumo de maçã/néctar de maçã representou a principal fonte de ingestão de patulina, segundo o mesmo estudo, apresentando um valor de exposição de 0,3 ng/Kg de peso corporal/dia<sup>96</sup>. Comparando com o valor de DSAP (0,4 µg/Kg de peso corporal) a exposição da população portuguesa à patulina era bastante inferior ao valor referido.



Contudo, são poucos os estudos sobre a ingestão diária de patulina através do consumo de maçã em crianças (tabela 3).

**Tabela 3:** Estudos realizados em alimentação infantil, relativamente à exposição à patulina através do consumo de maçã.

Peso corporal (Kg)	Exposição (ng/Kg peso corporal/dia)	Referência
ni	40,9	97
ni	9	98
10	180	99
ni	86,4	90
25	155	88
ni	80	92
10	252	88

ni – não identificado.

Mesmo assim, é importante aplicar medidas que visem a redução e prevenção da contaminação dos frutos pela patulina, evitando o desenvolvimento dos fungos na fruta e respetivos produtos derivados, em especial nos produtos à base de maçã. Neste sentido, devem ser aplicadas as medidas recomendadas pela Comissão europeia de 11 Agosto de 2003 (2003/598/CE), relativa à prevenção e redução da contaminação por patulina do sumo de maçã e dos ingredientes do sumo de maçã noutras bebidas<sup>100</sup>.

## 1.6 Objetivos

As crianças constituem um grupo vulnerável da população devido às suas características fisiológicas e metabólicas, apresentando uma dieta restrita nos primeiros tempos de vida. O facto de poderem estar expostas a contaminantes presentes nos alimentos, como as

micotoxinas, constitui uma preocupação pelo que urge desenvolver e implementar novas ferramentas que permitam efetuar estudos de exposição a contaminantes através da alimentação. Não existem dados disponíveis sobre as crianças portuguesas neste domínio pelo que este trabalho é pioneiro contribuindo para a análise de risco a contaminantes químicos alimentares.

O presente estudo tem como objetivo efetuar um estudo piloto sobre a avaliação da exposição a uma micotoxina com impacto na alimentação infantil, a patulina, de um grupo de crianças, através do consumo de alimentos infantis à base de maçã. Este trabalho tem como base uma colaboração do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge e o Instituto 'Jožef Stefan' e cujos responsáveis são a Dra. Elsa Vasco e Dra. Barbara Seljak, respetivamente.

Para o efeito foram incluídos neste trabalho os seguintes objetivos específicos:

- Tradução, adaptação e melhoria de uma plataforma informática *online* capaz de ser utilizada como diário alimentar;
- Aplicação do diário alimentar a um grupo de crianças dos 0 aos 3 anos de idade;
- Determinação do conteúdo em patulina nos alimentos infantis à base de maçã por HPLC com deteção por ultravioleta;
- Avaliação da exposição das crianças a patulina através do consumo de alimentos infantis à base de maçã.

## Capítulo II - Metodologia

A fim de avaliar a exposição à patulina de um grupo de crianças, através do consumo de alimentos infantis à base de maçã, foram desenvolvidos estudos com vista à obtenção de dados de consumo e dados de ocorrência de patulina nestes alimentos. Neste capítulo descrevem-se as metodologias utilizadas no trabalho, tal como, os procedimentos desenvolvidos para a obtenção dos dados de consumo através da aplicação de uma plataforma informática, os métodos analíticos para a preparação de amostras e quantificação dos teores de patulina, usados posteriormente nos cálculos de avaliação da exposição

### **2.1 Tradução, adaptação e melhoria de uma plataforma informática *online* capaz de ser utilizada como diário alimentar**

#### **2.1.1 Seleção da plataforma informática para utilização como diário alimentar**

Os programas de avaliação nutricional *online* são frequentemente utilizados pois podem maximizar a eficácia do aconselhamento nutricional ao permitir um *feedback* automático, adaptado ao utilizador<sup>101</sup>.

É uma necessidade iminente obter informações nutricionais precisas e de fácil acesso pois os profissionais da saúde dependem cada vez mais de meios informáticos (softwares) confiáveis e robustos<sup>102</sup>. Existem atualmente algumas plataformas informáticas de avaliação nutricional que procuram auxiliar os nutricionistas na orientação alimentar, tal como o EPIC-SOFT, um *software* desenvolvido para inquéritos alimentares nacionais da União Europeia<sup>38</sup>; o SPARE, programa em português que permite planear e avaliar ementas escolares; o MICRODIET, *software* projetado especificamente para profissionais com a finalidade de analisar as dietas de pacientes com doenças relacionadas com a alimentação e a plataforma OPEN.

A plataforma *online* de nutrição (OPEN) foi desenvolvida por investigadores do Departamento de Sistemas e Computadores do Instituto 'Jožef Stefan' na Eslovénia em

colaboração com outras instituições que encontra-se disponível *online* na língua Eslovena e Inglesa (<http://www.opkp.si>). É uma aplicação baseada na *web* destinada à avaliação da ingestão de nutrientes e consumo de alimentos para crianças e adultos, assim como, para o planeamento da dieta personalizada<sup>103</sup>.

Quando foi desenvolvida a ferramenta OPEN destinava-se principalmente para nutricionistas clínicos e médicos do Ambulatório de Pediatria do Instituto de Oncologia de Ljubljana, Hospital Universitário – infantil e Centro Médico da Universidade de Liubliana na Eslovénia, e servia para ajudar a avaliar os hábitos alimentares dos pacientes, fazer planos alimentares e planear os menus durante o tratamento<sup>104</sup>. Atualmente, para além das funcionalidades referidas, a plataforma está igualmente disponível ao utilizador comum.

A plataforma pode aplicar qualquer tabela da composição dos alimentos (TCA) concordante com os procedimentos do *European Food Information Resource* (EuroFIR), o que facilita o acesso ou a troca de dados de composição de alimentos de alta qualidade e tem em atenção às recomendações nutricionais de vários países da Europa<sup>103</sup>.

A avaliação do consumo alimentar através da plataforma OPEN maximiza vários fatores: eficácia dos profissionais de saúde pela facilidade de inserção dos dados; capacidade de visualização de nutrientes individuais ao serem digitados; apresentação de medidas em peso, volume ou medidas caseiras; possibilidade de conferir a edição das listas com alimentos; e capacidade de comparar os resultados com uma variedade de padrões alimentares<sup>101</sup>.

Há um número de vantagens cognitivas no uso de computadores para avaliação alimentar, tal como uma melhor comunicação através de fotos; a lógica na sequência de questões; menor conflito devido a perguntas socialmente indesejáveis; capacidade de recolher dados num ambiente neutro (no caso de autoavaliação). Por outro lado, é necessário que tanto o entrevistador como o entrevistado tenha habilidades informáticas<sup>101</sup>.

## **2.2 OPEN - Plataforma nutricional online**

A plataforma portuguesa, objeto de estudo neste trabalho, baseia-se na plataforma *online* de nutrição clínica OPEN. O desenvolvimento desta plataforma incluiu a tradução para a língua Portuguesa, a introdução dos dados de composição nutricional de acordo com a

tabela de composição de alimentos Portuguesa, a melhoria de alguns itens de caracterização individual e a introdução de novos alimentos. A adaptação desta plataforma tem em vista a sua utilização como diário alimentar.

### 2.2.1 Tradução para Português, adaptação e melhoria

Para a tradução da plataforma para a língua portuguesa deve-se aceder com um login predefinido, através do endereço “http://pt.opkp.si” e clicar na opção “manutenção”. A página Web definida como manutenção apresenta listas com palavras em inglês e o respetivo espaço para introdução da palavra, expressão ou frase correspondente em português, como exemplificado na figura 3. Efetuar a tradução das 214 páginas disponibilizadas, tendo em conta a língua portuguesa e os termos científicos aplicados em Portugal.

The screenshot shows a web application interface for translation. At the top, there is a navigation bar with links: AVALIAÇÃO, LISTA DE ALIMENTOS, DIÁRIO ALIMENTAR, MANUTENÇÃO (selected), INÍCIO, INTRODUÇÃO, and AJUDA. Below the navigation bar, there is a section titled 'Tradução'. It contains a search bar with 'Texto' and 'Pesquisa' buttons. Below the search bar, there are three rows of text: 'Inglês britânico' and 'português europeu'. The first row shows 'How much potato do you consume per week?' and 'Quantas batatas comece por semana?'. The second row shows 'How much grains do you consume per week?' and 'Qual a quantidade de cereais que comece por semana?'. The third row shows 'How much bread & bakery products do you consume per week?' and 'Quanto produtos de pastelaria comece por semana?'. Below this, there is a list of 214 items. The list is divided into two columns. The left column contains items: F0A, Zn, C10:1N0, VL, RIBF, C10:0, F. The right column contains items: H1A, Zn, C10:1N0, VL, RIBF, C10:0, F. The list is numbered 195 to 214. Item 214 is highlighted in blue. At the bottom, there is a pagination bar with links 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, and 214.

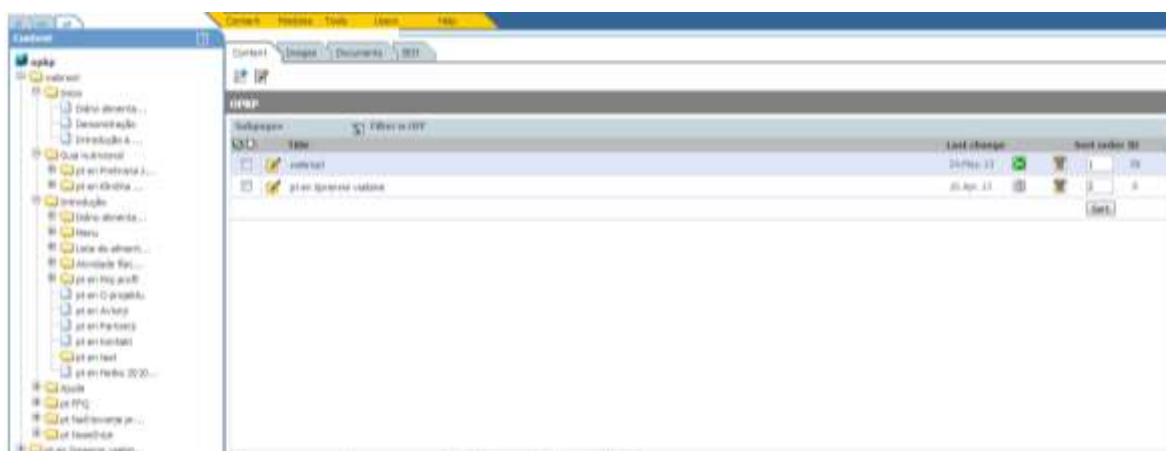
**Figura 3:** Método de tradução da plataforma para a língua Portuguesa.

Certificar de forma rigorosa todas as palavras traduzidas e confirmar a sua inclusão na plataforma disponibilizada *online*. Se necessário, ajustar novamente as palavras através da mesma opção anterior.

Para as palavras, expressões e/ou frases que não se encontram nas tabelas anteriores e/ou que se encontram em esloveno utilizar um programa informático UREDNIK, disponibilizado em “<https://www.urednik.si/>”, caracterizado como editor técnico de páginas web e dividido em módulos com conteúdos programáveis que tem a capacidade de alterar todo o conteúdo da plataforma.

Definir cada módulo programável, com um título desejado, que servirá posteriormente como uma página visível na plataforma. Em cada módulo, proceder à tradução do conteúdo existente em esloveno e/ou introduzir novos conteúdos. Editar todas as imagens e respetivas legendas, informação e textos.

Reajustar os módulos definidos e a informação que deverá estar disponível ao público-alvo (figura 4).



**Figura 4:** Método de tradução via programa informático UREDNIK.

Com a finalidade de ajustar o valor nutricional dos alimentos na plataforma à população portuguesa, adicionar à plataforma a tabela de composição dos alimentos Portuguesa (TCA) que se encontra formatada de acordo com os requisitos do EuroFIR.

Como a TCA portuguesa não tem dados nutricionais dos alimentos destinados à alimentação para crianças, o alvo deste estudo, e como apenas se pode introduzir na

plataforma dados nutricionais formatados pelos requisitos do EuroFIR foram usados dados nutricionais de alimentação infantil da tabela de composição dos alimentos Holandesa, como papas de fruta, refeições preparadas e leites. Estes dados serão substituídos por dados portugueses, assim que, a nossa tabela seja atualizada com os valores nutricionais de alimentação infantil.

Ao nível da caracterização individual, introduzir no perfil do utilizador as opções data de nascimento, local administrativo e código de identificação.

## **2.3 Aplicação do diário alimentar a um grupo de crianças até dos 0 aos 3 anos de idade**

### **2.3.1 Seleção da amostra**

Selecionar os funcionários do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA) cujos filhos tenham idades compreendidas entre 0 e 3 anos (inclusive).

### **2.3.2 Os participantes**

A todos os funcionários do INSA cujos filhos tenham idades entre 0 e 3 anos enviar por *e-mail* um consentimento informado do estudo proposto (para validar por assinatura) e instruções para preenchimento do diário alimentar na plataforma *online* (Anexo I). Será garantida ainda a confidencialidade das informações que venham a ser recolhidas.

Serão excluídos os funcionários que não assinarem o consentimento informado ou que não preencham o diário alimentar.

### **2.3.3 Aplicação do diário alimentar**

Os participantes seguem as instruções que recebem, de forma a preencher na plataforma *online* os dados individuais da criança, tais como, dados pessoais, antropométricos e clínicos e o diário alimentar. É solicitado aos participantes, aplicar o diário alimentar durante 3 dias, dois dias úteis e um dia do fim-de-semana, não necessariamente em dias consecutivos e que os alimentos ingeridos nesse período de tempo sejam devidamente pesados e medidos, com base nas informações nutricionais existentes nos rótulos das embalagens ou através das medidas caseiras referidas na plataforma.

### 2.3.4 Tratamento dos resultados

Para o tratamento dos resultados proceder ao *download* em formato Excel™ dos dados de consumo da criança introduzidos na plataforma e construir uma base de dados para o efeito e tratar os resultados através do programa SPSS (versão17.0).

## 2.4 Determinação do conteúdo em patulina nos produtos para alimentação infantil à base de maçã

Os ensaios para determinar os teores de patulina, são realizados no laboratório de química do Departamento de Alimentação e Nutrição, do INSA, de acordo com a norma NP EN ISO/IEC 17025<sup>105</sup>, de modo a garantir a utilização de um método validado, aplicação de procedimentos de controlo interno da qualidade e participação em ensaios de aptidão.

No presente estudo, o método analítico aplicado na determinação de patulina em alimentos segue os requisitos estabelecidos pelo Regulamento (CE) 401/2006<sup>73</sup> e o procedimento descrito por Barreira *et al.* O método analítico inclui a extração em fase sólida e determinação por cromatografia líquida de alta eficiência com detetor de ultravioleta (SPE-HPLC-UV)<sup>16</sup>. Este método envolve a extração da patulina do género alimentício com uma mistura de solventes orgânicos (n-hexano e acetato de etilo) na presença de sulfato de sódio e hidrogenocarbonato de sódio seguido de purificação por extração em fase sólida (SPE). O extrato purificado é evaporado até à secura em corrente de azoto e dissolvido em água pH=4. A quantificação da patulina é efetuada por HPLC com deteção por ultravioleta (UV) a um comprimento de onda de 276 nm. O método apresenta as seguintes características (tabela 4):

- O limite de deteção (LOD) – “teor mínimo medido, a partir do qual é possível detestar a presença do analíto com uma certeza estatística razoável”<sup>106</sup> e tem o valor de 0,9 µg/Kg<sup>16</sup>;
- O limite de quantificação (LOQ) - “a menor concentração do analíto que pode ser quantificado na amostra, com exatidão e precisão aceitável”<sup>106</sup> e tem o valor de 2,9 µg/Kg<sup>16</sup>;



- A repetibilidade define-se por “valor abaixo do qual se pode esperar que o valor absoluto da diferença entre os resultados de dois testes determinados, obtidos em condições de repetibilidade, nomeadamente a mesma amostra, o mesmo operador, os mesmos aparelhos, o mesmo laboratório e um intervalo curto, se situe dentro de limites específicos de probabilidade (normalmente 95%)” <sup>74</sup>. O coeficiente de variação entre as repetições deve ser inferior ou igual a 30% para teores de patulina inferiores a 20 µg/Kg e, inferior ou igual a 20% para teores de patulina entre 20-50 µg/Kg.

**Tabela 4:** Características do método analítico.

<b>Desempenho do Método</b> <b>(acreditado segundo ISO 17025)</b>	
Gama de Trabalho (µg L <sup>-1</sup> )	8 – 100
LOQ (µg kg <sup>-1</sup> )	2,9
LOD (µg kg <sup>-1</sup> )	0,9
Repetibilidade (RSD <sub>r</sub> ) (%)	7
Precisão Intermédia (RSD <sub>R</sub> ) (%)	8
Taxa de Recuperação média (%)	75

### 2.4.1 Amostras

As amostras utilizadas no estudo (sumos e purés à base de maçã) são adquiridas em lojas de conveniência e hipermercados da região de Lisboa. Selecionar uma variedade de marcas, tendo em consideração as marcas mais representadas nos diferentes estabelecimentos comerciais.

Por considerar que o sumo de maçã é bastante consumido pelas crianças, a partir do momento em que estas adotam uma alimentação semelhante à dos adultos (a partir dos

12 meses), além dos alimentos destinados a lactentes e crianças jovens é incluído também no estudo, os sumos à base de maçã destinados aos consumidores em geral.

## **2.4.2 Equipamentos**

- Agitador cambalhota Heidolph, modelo Reax 2.
- Aparelho de pH com eléctrodo combinado de vidro e sonda de temperatura, Metrohm, modelo 827 pH Lab.
- Balança Mettler Toledo, modelo AG 245.
- Balança Mettler Toledo, Modelo PB 3002/Fact.
- Banho ultrasons Grant, modelo MXB6.
- Bomba de vácuo Diaphragm vacuum pump, modelo MZ 2C.
- Centrifuga eppendorf, modelo 5804R.
- Concentradores a vácuo para SPE (24 posições), Macherey-Nagel.
- Cromatógrafo líquido de alta resolução (HPLC), Waters Alliance, modelo 2695, equipado com:
  - Amostrador automático com capacidade para 120 amostras e controlo de temperatura programável entre 4 e 40 °C;
  - Bomba quaternária;
  - Compartimento termostaticado para coluna, com temperaturas que variam entre 5 °C acima da temperatura ambiente e 65 °C;
  - Detetor de díodos, Waters, modelo 2998;
  - Desgaseificador;
  - Injetor automático;
  - “Loop” de 2000 µL;
  - *Software* Waters, Empower II versão 6.10.01.00.
- Evaporador de corrente azoto com banho de água Caliper, modelo Turbovap LV.
- Espectrofotómetro UV-Visível Thermo Scientific, modelo Evolution 300LC.
- Sistema de obtenção de água ultra-pura Millipore, modelo Milli-Q Advantage.
- Vortex, IKA modelo Genius 3.

## **2.4.3 Materiais**

- Cartuchos para extração em fase sólida, Sílica gel, Strata SI - 1,55 µm, 70Å, 500 mg/3 mL, Phenomenex.

- Células de quartzo com percurso ótico de 1 cm.
- Coluna analítica de HPLC, 250 x 4,6 mm x 5 µm, Synergi Hydro-RP C18, Phenomenex, com Pré-coluna 4 x 3 mm i.d. Hydro-RP C18, Phenomenex.
- Filtros de seringa Acrodisc LC, 13 mm diâmetro, poro 0,45 µm, membrana em PVDF, PALL.
- Membranas para filtração de solventes para HPLC, filter type HV, 47 mm diâmetro, poro 0,45 µm, Millipore.
- Membranas para filtração de solventes para HPLC, filter type Fluoropore, 47 mm diâmetro, poro 0,45 µm, Millipore.
- Micropipetas de 200 µL e 1000 µL, Gilson.
- Seringa de 100 µL, Exmire.
- Seringa de 500 µL, Hamilton.
- Sistema de filtração de solventes constituídos por copo de vidro, funil, pinça metálica e kitasato.
- Tubos de centrífuga, com rosca, PVC, 50 mL.
- Tubos de vidro 16 x 100 mm para evaporador de corrente azoto Turbovap.
- Vials de 2 mL com tampa de rosca e septo de teflon pré-perfurado, para amostrador automático de HPLC, Waters Alliance 2695.

(Nota: O material descrito é o utilizado especificamente para o estudo, não referindo o material frequente de laboratório).

#### 2.4.4 Reagentes

- Água ultra-pura (Millipore).
- Acetonitrilo, (CH<sub>3</sub>CN), para HPLC, RS Plus, Carlo Erba Reagents.
- Acetato de etilo, (CH<sub>3</sub>COOC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>), para LC, Merck.
- Ácido acético glacial 100%, (CH<sub>3</sub>COOH), p.a., Merck.
- Ácido perclórico 60%, (HClO<sub>4</sub>), p.a., Merck.
- Areia do mar purificada com ácido e calcinada, grão fino, (SiO<sub>2</sub>), Merck.
- Etanol absoluto, (CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH), para LC, Merck.
- n-Hexano, (C<sub>6</sub>H<sub>14</sub>), Lichrosolv, Merck.
- Sulfato de sódio anidro, (Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>), p.a., Merck.
- Hidrogenocarbonato de sódio, (NaHCO<sub>3</sub>), p.a., Merck.
- Patulina (4-hidroxi-4H-furo (3,2-c)pirano-2(6H)-ona, ≥ 98% (TLC), Sigma.

## **2.4.5 Soluções**

### **2.4.5.1 Soluções gerais**

- Água a pH=4.

(Composto por água ultrapura a pH=4 e ácido acético (0,2%)).

- Ácido acético em acetato de etilo.

(Composto por ácido acético glacial 100% e acetato de etilo).

- Ácido acético 0,2%.

(Composto por ácido acético glacial e água ultrapura).

- Solução de extração acetato de etilo-n-hexano (60+40, v/v).

(Composto por acetato etilo e n-hexano).

- Fase móvel para HPLC.

(Composto por água ultrapura, acetonitrilo e ácido perclórico a 60%).

### **2.4.5.2 Soluções de calibração**

- Solução padrão de calibração ( $\pm 10$  mg/L).

### **2.4.5.3 Soluções padrão de fortificação**

- Solução mãe de fortificação ( $\pm 200$  mg/L).
- Solução padrão intermédia de fortificação ( $\pm 10$  mg/L).
- Solução padrão de fortificação ( $\pm 1$  mg/L).

### **2.4.5.4 Soluções padrão de controlo**

- Solução controlo 1 de patulina ( $\pm 8$   $\mu$ g/L).
- Solução controlo 2 de patulina ( $\pm 25$   $\mu$ g/L).
- Solução controlo de fortificação de patulina ( $\pm 40$   $\mu$ g/L).

## **2.5 Técnica**

Todos os procedimentos descritos em seguida são efetuados em duplicado.

### **2.5.1 Pesagem da amostra**

Pesar rigorosamente cerca de 10,0 g de amostra para tubo de centrífuga de 50 mL. Em caso de amostras líquidas em que o resultado final deve ser dado em  $\mu\text{g/L}$ , a toma de ensaio deve ser de 10,0 mL em vez de 10,0 g. No caso de amostras líquidas, anotar também o peso.

No caso dos estudos de recuperação, pesar rigorosamente 10,0 g de amostra (puré ou sumo) em tubo de centrífuga de 50 mL. Adicionar 200  $\mu\text{L}$  da solução padrão de fortificação 1  $\mu\text{g/mL}$  tendo o cuidado de depositar a solução sobre a amostra, evitando tocar nas paredes do tubo. Agitar a mistura amostra e padrão no vórtex durante 3 minutos para completa homogeneização.

### **2.5.2 Extração**

Adicionar a um tubo de centrífuga limpo, 2g de areia, 15 g de  $\text{Na}_2\text{SO}_4$  e 2g de  $\text{NaHCO}_3$ . Agitar, adicionar 10 mL de solvente de extração e fechar bem. O tubo de centrífuga está agora pronto para análise.

Transferir o conteúdo do tubo preparado anteriormente para o tubo de centrífuga que contém a amostra, com auxílio de um funil de bucal largo. Agitar vigorosamente com a mão durante alguns segundos e depois exatamente durante 5 minutos num agitador mecânico.

Centrifugar a mistura a baixa velocidade (1850 rpm ou 300-400 g) durante 1 minuto para promover a separação das 2 camadas.

### **2.5.3 Purificação do extrato por SPE**

Adicionar 50  $\mu\text{L}$  de ácido acético em acetato de etilo a um tubo de vidro com tampa de rosca de 10 mL e colocá-lo debaixo de um cartucho de SPE de sílica gel (não acondicionado).

Após extração transferir imediatamente 2,5 mL de extrato centrifugado para o cartucho e deixar eluir para o tubo de vidro de 10 mL, gota a gota (por exemplo, pela força da gravidade).

Eluir a patulina do cartucho de SPE com 3 mL da mistura de acetato de etilo e n-hexano (60+40 v/v). Após passagem da maior parte da solução de lavagem, forçar a saída do restante solvente para o tubo, ligando a bomba de vácuo durante alguns segundos.

Evaporar o eluído no Turbovap a 40 °C, 15 psi, durante aproximadamente 20 minutos.

Dissolver o resíduo com 1 mL de água pH=4. Agitar o tubo no vórtex durante 3 minutos para assegurar que a patulina está totalmente redissolvida. Filtrar com filtros de seringa de PDVF (13 mm diâmetro, poro 0,45 µm) para o “vial”. Analisar o extrato por HPLC-UV de acordo com as condições descritas em 2.5.4.

### 2.5.4 Análise cromatográfica

Na tabela 5 apresentam-se as condições analíticas utilizadas para a análise de patulina.

**Tabela 5:** Condições cromatográficas para a análise de patulina por HPLC-UV.

Parâmetro	Condições cromatográficas
Pré-coluna	C18, Phenomenex
Coluna cromatográfica	Synergi RP C18, Phenomenex, Fase reversa
Composição da fase móvel	Água:Acetonitrilo:Ácido perclórico (94:6:0,1)
Modo de eluição	Isocrático
Fluxo do eluente	1 mL/min
Temperatura da coluna	25 °C
Temperatura do amostrador	10 °C
Detetor de diodos (UV)	Comprimento onda fixo a 276 nm
Volume de injeção	200 µL

De modo a remover os interferentes que possuem tempos de retenção longos (muito superiores ao tempo de retenção da patulina), sendo por isso designados por “late eluting peaks”, proceder à lavagem do sistema com um gradiente com elevado teor de solvente orgânico. Este gradiente inclui um passo de lavagem com 60 a 90% de acetonitrilo durante aproximadamente 1-2 volumes da coluna, que corresponde a 3-6 minutos<sup>107</sup>.

A tabela 6 refere o programa de lavagem da coluna entre injeções de amostras.

**Tabela 6:** Programa de lavagem e de equilíbrio da coluna entre injeções de amostra.

<b>Tempo (min)</b>	<b>A (Fase móvel)</b>	<b>B (Acetonitrilo)</b>	<b>D (Água)</b>
	100	0	0
<b>3</b>	0	100	0
<b>4</b>	0	100	0
<b>9</b>	0	65	35
<b>10</b>	0	65	35
<b>11</b>	100	0	0
<b>30</b>	100	0	0

#### **2.5.4.1 Sequência da análise cromatográfica**

- Fase móvel.
- Água pH=4.
- Padrões da curva de calibração.
- Controlo cromatográfico da fortificação (40 µg/L).
- Amostras.
- Controlos cromatográficos da curva (8 e 25 µg/L).

### 2.5.5 Controlo de qualidade

De acordo com a acreditação pela ISO 17025, por cada série de amostras analisadas, devem incluir-se:

- Duplicados da amostra.
- Ensaios de recuperação.

Os critérios de aceitação dos duplicados são expressos em termos de diferença de duplicados (DD%) e apresentam critérios de aceitação variáveis de acordo com o nível de concentração (tabela 7) <sup>74</sup>.

**Tabela 7:** Critérios de aceitação das recuperações e duplicados.

Teor de Patulina	Recuperações (%)	Diferença entre duplicados (%)
<20	50-120	≤ 30%
20-50	70-105	≤ 20%
>50	75-105	≤ 15%

### 2.5.6 Cálculos

O pico da patulina é identificado com base no tempo de retenção do padrão, com os teores expressos em µg/L e calculados a partir da área do pico de patulina na amostra e por interpolação na curva de calibração (área vs concentração). O teor de patulina presente na amostra, em µg de patulina/Kg de amostra, é calculado através da equação 1.



**Equação 1:** Equação para calcular o teor de patulina nas amostras.

$$\text{Patulina } (\mu\text{g/Kg}) = C (\mu\text{g/L}) \times [ (v_3 (\text{mL}) \times v_1 (\text{mL})) / (v_2 (\text{mL}) \times m_1 (\text{g})) ]$$

Em que,

C - Concentração da solução de ensaio calculada a partir da curva de calibração.

M<sub>1</sub> - Massa da amostra utilizada para análise (10 g).

v<sub>1</sub> - Volume de solvente de extração (10 mL).

v<sub>2</sub> - Alíquota para SPE (2,5 mL).

v<sub>3</sub> - Volume de solução de água a pH=4 usada para dissolver o extracto (1 mL).

## **2.6 Avaliação da exposição das crianças a patulina através do consumo de alimentos infantis à base de maçã**

Para avaliar a exposição das crianças a patulina através do consumo de alimentos à base de maçã calcular a ingestão diária de patulina e comparar com a IDT. Para calcular a ingestão diária de patulina multiplicar o consumo dos alimentos (g) diário, pelo teor em patulina (µg/ kg) e dividir pelo peso corporal da criança (Kg). O valor da ingestão é expresso em µg de patulina por Kg de peso corporal por dia (Equação 2).

**Equação 2:** Cálculo da ingestão diária de patulina.

$$\text{Ingestão diária (patulina } (\mu\text{g/ kg}) / \text{ peso corporal (Kg) / dia)} = \frac{\text{Ocorrência de patulina } (\mu\text{g/Kg}) \times \text{Ingestão diária (g)}}{\text{Peso corporal (Kg)}}$$

Os dados de consumo diário resultam do ponto 2.3. Para cada tipo de alimento infantil à base de maçã ingerido pela criança resulta um valor de consumo em gramas.

Os conteúdos em patulina nos alimentos infantis à base de maçã resultam do ponto 2.4. Para cada tipo de alimento resulta um valor de ocorrência em µg de patulina por Kg de alimento.

De modo a criar diferentes cenários de exposição, calcular a média, a mediana e os percentis 90, 95 e 99 da ocorrência e, com estes valores calcular a ingestão diária de patulina.

Quando o valor de ocorrência de patulina se encontra abaixo do valor do LOQ ou do LOD é necessário decidir qual o valor a utilizar como valor de ocorrência do alimento. De acordo com a recomendação referida pela AESA, pode aplicar-se o método de substituição do valor tendo em conta o pior cenário de exposição. Se o resultado for reportado como inferior ao LOD, o valor imputado deverá ser igual ao LOD. No caso do resultado se encontrar entre o LOD e o LOQ atribuir o valor de LOQ. Para os resultados superiores ao LOQ manter os valores determinados<sup>105</sup>.

## Capítulo III - Resultados e discussão

### 3.1 OPEN - Plataforma nutricional *online*

A plataforma nutricional *online* (OPEN original) é uma ferramenta evolutiva que supera os atuais *softwares* nutricionais pela sua praticidade e qualidade. Com base num diário alimentar e dados individuais antropométricos é possível avaliar as alterações alimentares ao longo do tempo, planear mudanças e estabelecer objetivos alimentares.

A sua aplicação multi-facetada está de acordo com algumas referências na bibliografia. A Open Portugal está de acordo com os pressupostos de Reslan *et al.*, que justifica o uso da ferramenta *online* pois envolve redução de custos, aumenta o sigilo do utilizador e a capacidade de obter mais amostras de consumos<sup>108</sup>. Por outro lado, refuta também a opinião de G. Biró *et al.*, que refere a escassez de métodos de avaliação nutricional para comparação fiável de numerosos grupos da população<sup>56</sup>.

#### 3.1.1 Página inicial

Através do endereço “<http://www.opkp.si>” que dá acesso à OPEN original é possível entrar na página de introdução da plataforma que, apresenta uma estrutura em três áreas de aplicação: (1) lista de alimentos; (2) diário alimentar e (3) plano alimentar.

Encontra-se na figura 5, a página de introdução da OPEN original na sua versão em inglês, com um item de escolha para a língua eslovena. A figura 6 corresponde à página de início da OPEN Portugal adaptada para português.

O registo na plataforma é efetuado de forma livre por qualquer utilizador, embora seja recomendado o acompanhamento de um profissional.



**Figura 5:** Página inicial da OPEN original antes de ser adaptada para português.



**Figura 6:** Página inicial da OPEN Portugal depois de ser adaptada para português.

Na página inicial da plataforma é possível efetuar o registo do utilizador através da introdução de um *e-mail*, nome de utilizador e password. No caso da OPEN Portugal o acesso ainda não é livre ao utilizador comum.

### **3.1.2 Identificação do utilizador**

Após o registo na plataforma, surge a página do perfil de utilizador, para a introdução dos dados pessoais. No perfil, além da identificação pessoal, peso, altura e possíveis alergias/doenças alimentares, é possível introduzir a data de nascimento, o local administrativo e o código de identificação (figura 7). A data de nascimento, item novo introduzido na OPEN Portugal, permite identificar em qualquer altura a idade do utilizador, o que não acontece na OPEN original, onde o utilizador identifica o grupo etário a que pertence, o que para alguns estudos futuros não é suficiente. O local administrativo foi uma das alterações efetuadas em relação à OPEN original. Neste sentido, foram introduzidos os itens distrito, concelho e freguesia aos quais se encontram associadas as respetivas listas controladas de distritos, concelhos e freguesias existentes em Portugal, respetivamente.

**OPEN Portugal Clinical Nutrition**

Idade: 1 anos

Perfil Log out

AVALIAÇÃO LISTA DE ALIMENTOS DIÁRIO ALIMENTAR PLANO ALIMENTAR RECEITAS INÍCIO INTRODUÇÃO AJUDA

**Perfil** Recomendações

Nome de utilizador:

e-Mail:

[Alterar password](#)

Nome:

Apelido:

Genêro: ☒ Masculino ☐ Feminino

Código de identificação (Profissional de saúde):

Distrito: LISBOA

Concelho: MAFRA

Freguesia: MAFRA

Grupo: Omitir

Data de nascimento: 3 Abr 2012

Altura (cm): 76

Peso (Kg): 10,5

☐ Diabetes

☐ Celíaca

☐ Alergia a noz

☐ Alergia a ovos

☐ Alergia ao leite

☐ Hipertensão arterial

☐ Intolerância ao glúten

☐ Dieta sem carne

☐ Fenilcetonúria

☐ Intolerância à lactose

Mostrar unidades: ☒ Sim ☐ Não

Ativar escala: Não

[guardar](#)

**Nutricionista clínico ou médico**

**O meu nutricionista clínico ou médico**

*Sem acompanhamento profissional*

O profissional de saúde pode ter controlo das suas atividades através da plataforma.

Poderá definir o seu perfil, controlar a alimentação e os registos de atividade, com a finalidade de criar refeições equilibradas.

**Adicionar novo acesso**

Para permitir acesso à sua conta, crie uma password selecionando "criar password" e envie para o nutricionista clínico ou médico através do email ou telefone.

O seu nutricionista clínico ou médico pode configurar o seu perfil e controlar as suas atividades.

[Criar uma password](#)

**Figura 7:** Página da OPEN Portugal do perfil do utilizador.

A introdução do local administrativo no perfil tem a intenção de conferir ligação entre os diferentes perfis de utilizador através dos distritos, dos concelhos e/ou das freguesias de Portugal, possibilitando direcionar diversos estudos no âmbito da saúde para uma população alvo.

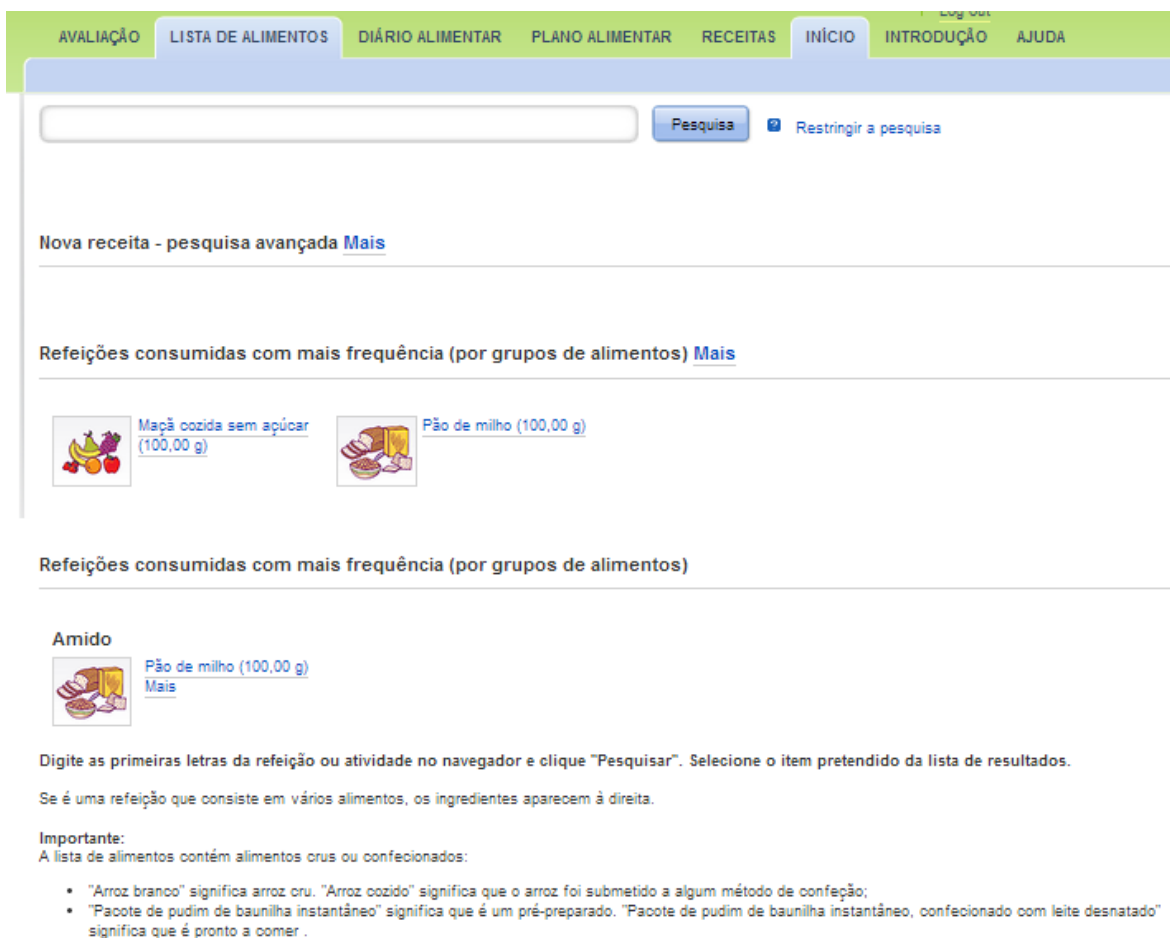
A introdução do código de identificação na página da OPEN Portugal permite trabalhar com utilizadores de forma anónima, pois não será atribuído o nome mas apenas um código aos utilizadores.

A referência à data de nascimento e aos dados antropométricos no perfil do utilizador além de ser importantes para qualquer tipo de estudo de vigilância possibilita a atribuição

automática dos valores de recomendação nutricionais individuais. Desta forma, o *software* procede aos cálculos e efetua de forma automática a avaliação nutricional do utilizador em estudo. A referência às intolerâncias alimentares tem a finalidade de evitar situações de risco para o utilizador. Conforme a intolerância, o *software* disponibiliza o potencial risco e recomenda a diminuição ou o aumento da ingestão de determinado grupo de alimentos.

### **3.1.3 Lista de alimentos**

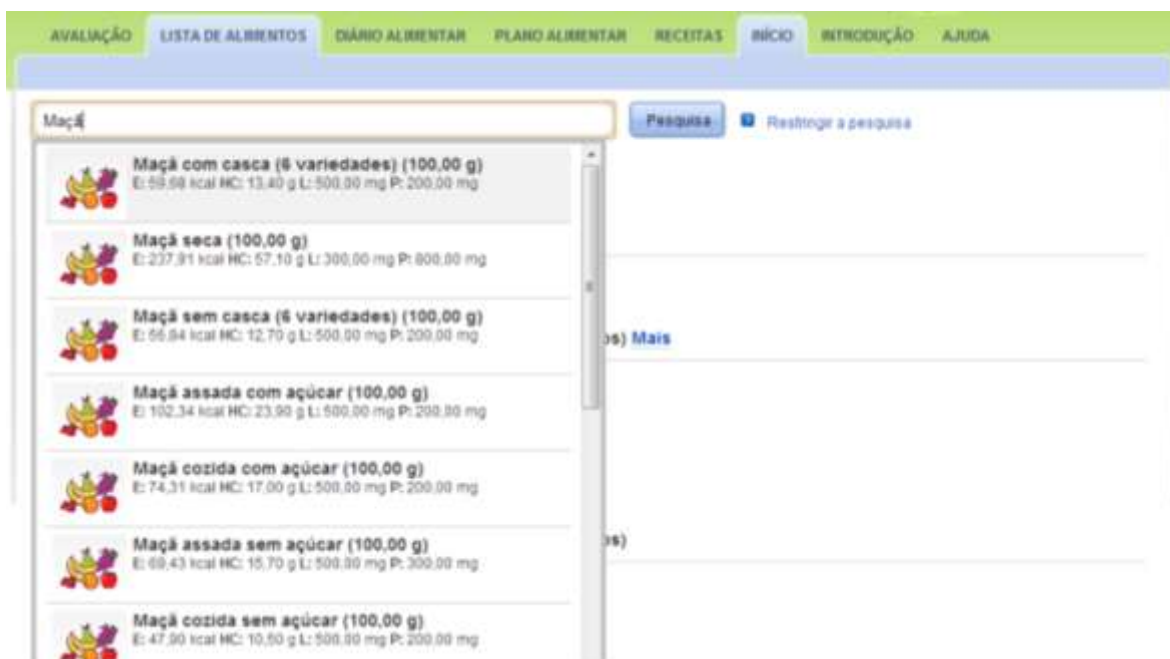
Na lista de alimentos encontram-se os dados necessários para o preenchimento do diário alimentar. Esta lista de alimentos tem como base, na OPEN Portugal, a tabela da composição dos alimentos Portuguesa, o que torna esta plataforma uma mais-valia nacional uma vez que a composição dos alimentos é específica do país. De modo a facilitar a seleção dos alimentos, a plataforma regista os alimentos mais consumidos e coloca-os em destaque como “Refeições consumidas com mais frequência” (figura 8).



**Figura 8:** Página da OPEN Portugal da lista de alimentos.

Para se seleccionar novos alimentos a partir da tabela de composição dos alimentos portuguesa é apenas necessário introduzir o nome do alimento e efetuar a pesquisa, como é exemplificado na figura 9.





**Figura 9:** Página da OPEN Portugal para a pesquisa dos alimentos existentes na tabela da composição dos alimentos Portuguesa.

Desta forma, a plataforma permite a realização de avaliações nutricionais de forma padronizada para a população Portuguesa, pois todas as informações quanto aos alimentos, bebidas, receitas e suplementos alimentares consumidos durante o estudo são inseridos e codificados. A introdução dos alimentos e respetivos valores nutricionais atribuídos em Portugal possibilitam a caracterização dos problemas nutricionais e, o estudo da relação entre alimentação e estado de saúde ou doença de indivíduos e populações, tornando-se mais específico à população portuguesa e instigando futuros estudos etiológicos e epidemiológicos.

### 3.1.4 Diário alimentar

No diário alimentar a introdução dos alimentos é por digitação do alimento ou seleção na própria lista disponível da base de dados e atribuída por refeição (desde o pequeno-almoço à ceia). O utilizador tem a possibilidade de gravar as refeições na ordem que pretender, contudo a configuração inicial padrão começa pelo pequeno-almoço (figura 10). A quantidade dos alimentos é igualmente introduzida pelo utilizador e disponibilizado em gramas.

Já inseriu os seus dados clínicos (diários)?

**Pequeno-almoço | 09:30** E: 187,56 kcal HC: 30,46 g L: 4,66 g P: 5,55 g Apagar

Pão de forma, de trigo, enr..., 45,00 g	Queijo creme para barrar, 10,00 g	Bolacha integral (trigo), 8,00 g

[Editar refeição](#)

**Total por dia** ?

TOTAL      Ingestão Diária Recomendada:  
**1 029,40 kcal / 1 400,00 kcal**

**Almoço | 13:00** E: 192,33 kcal HC: 22,00 g L: 7,85 g P: 8,25 g Apagar

Arroz de tomate com azeite, 100,00 g	Soja cozida sem sal, 50,00 g	

[Editar refeição](#)

**Lanche da tarde 1 | 16:00** E: 35,22 kcal HC: 5,25 g L: 1,25 g P: 704,00 mg Apagar

Bolacha integral (trigo), 8,00 g		

	Quantidade	% valor diário
Proteína	51,76 g	100%
Teor total em lípi...	36,49 g	77%
Teor total em hid...	122,17 g	71%
VL	11,85 g	84%
Compostos inorg...	-	
H2O	752,50 g	27%

**Figura 10:** Página da OPEN Portugal do diário alimentar e ingestão diária recomendada.

O conceito de medida e a capacidade de memória influenciam a precisão das estimativas de ingestão, portanto para simplificar e diminuir o risco de erro, a plataforma disponibiliza um guia padrão de porções equivalentes, como se verifica na figura 11.

Unidade de medida		
	<b>Colher de chá: 3-10g</b>	
	Por exemplo:	
	Sal: 5g	
	Açúcar: 5g	
	<b>Colher de sopa: 10-20g</b>	
	Por exemplo:	
	Farinha: 10g	
	Óleo: 10g	
	Arroz: 10g	
	<b>Chávena (2,5 dcl): 20-250g</b>	
	Por exemplo:	
	Flocos de milho: 25g	
	Ervilhas: 110g	
	Arroz parcialmente cozido: 150g	
	Farinha: 150g	
	Açúcar: 175g	
	Cenoura ralada: 225g	

**Figura 11:** Unidades de medida apresentadas na OPEN Portugal.

É igualmente possível adicionar ou remover os alimentos após a introdução no diário alimentar, uma vez que todo o manuseamento da plataforma é estruturado para ser de uso livre.

O diário alimentar dispõe de espaços em branco, para que o utilizador possa introduzir manualmente a descrição da confeção ou outros pormenores relevantes das refeições e, faculta também a possibilidade de introduzir a hora do consumo. Caso o alimento não se encontre na lista pré-definida, a plataforma apresenta a opção de propor um alimento desde que devidamente caracterizado. No entanto, é um procedimento desaconselhado, uma vez que o alimento ao ser introduzido pelo utilizador não inclui toda a informação nutricional necessária.

Na figura 12 é possível observar os resultados dos cálculos que a plataforma efetua automaticamente em relação à ingestão de nutrientes e alimentos e, a sua comparação com a recomendação diária. Os valores são estimativas brutas com base na informação inserida e pré-definida pela plataforma. Conforme se introduz os alimentos no diário alimentar, a plataforma reajusta os valores recomendados, baseando-se nos valores máximos atribuídos a cada nutriente e expõem os consumos em excesso de acordo com a pirâmide alimentar.

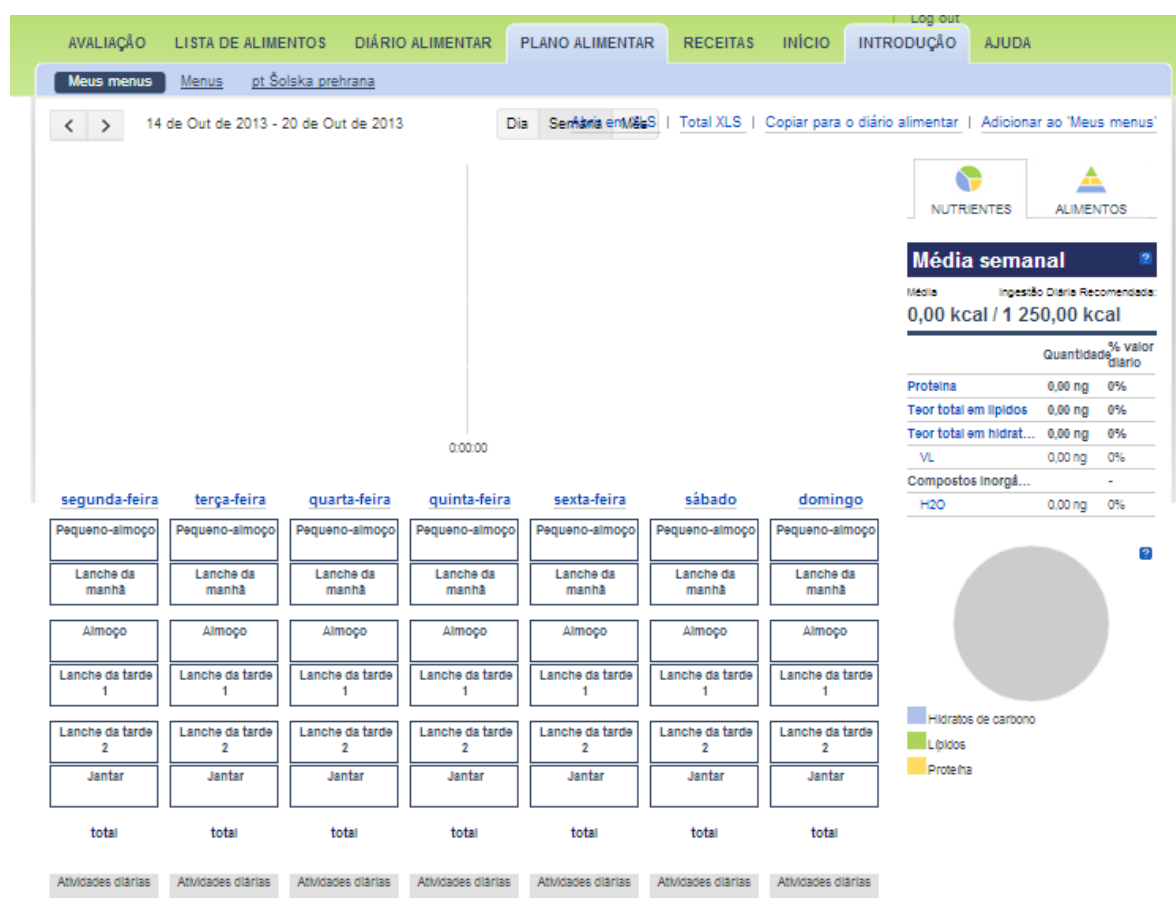


**Figura 12:** Avaliação nutricional disponibilizada na OPEN Portugal.

### 3.1.5 Plano alimentar

O plano alimentar semanal disponibilizado na plataforma, não só é conveniente como flexível, possibilitando a variabilidade das refeições. Como se verifica na figura 13, a plataforma recomenda o planeamento de 6 refeições diárias com o igual acompanhamento nutricional através da pirâmide alimentar.

Com a finalização do plano, os dados são disponibilizados para impressão em ficheiro Excell (XLS).



**Figura 13:** Página da OPEN Portugal do plano alimentar.

Tendo em conta os valores de ingestão diária recomendada e a sua distribuição pela pirâmide alimentar, o planeamento das refeições com antecedência permite maximizar e

organizar as refeições diárias de forma mais consciente, tornando-se num incentivo à aquisição de alimentos saudáveis e à conjugação de refeições equilibradas. No plano alimentar não foi efetuada nenhuma alteração de base.

### 3.1.6 Receitas

No item receitas não foi efetuada nenhuma alteração visto ainda não existir no INSA, uma listagem de receitas tradicionalmente portuguesas, em ficheiro compatível. A plataforma também permite a introdução de receitas, no entanto, este procedimento é desaconselhado, pois a receita ao ser introduzida pelo utilizador não é controlada.

### 3.1.7 Ajuda

Neste item, a plataforma apresenta uma assistência completa para uma utilização fácil e adequada (figura 14).



**Figura 14:** Assistência da OPEN Portugal.

As informações introduzidas no diário alimentar e na plataforma ficam registadas permanentemente, logo com esta tecnologia informática moderna é possível realizar simulações de avaliação nutricional e potencial exposição de várias fontes.

### 3.1.8 Discussão final

De acordo com a AESA, para manter uma padronização das diferentes bases de dados, é importante a disponibilização de uma versão de *software* nutricional por cada país<sup>38</sup> e neste sentido a plataforma OPEN Portugal segue os pressupostos, pois tem como base a tabela da composição dos alimentos Portuguesa.

A OPEN Portugal apresenta dados de ingestão nutricional de forma funcional e possibilita o armazenamento, produção e exportação dos diários alimentares de forma padronizada e sofisticada.

Relativamente à análise de dados, o *software* tem a capacidade de recomendar as porções alimentares (que noutras plataformas representam a maior fonte de erro) e estimar a ingestão recomendada a partir dos dados adquiridos.

A abordagem *online* permite: (1) acompanhar melhor as alterações no comportamento alimentar, devido à manutenção dos registos ao longo do tempo, (2) aumentar o número de interesse por parte dos utilizadores, (3) obter a descrição precisa dos alimentos consumidos, devido à base de dados contendo os alimentos típicos portugueses, (4) conferir auxílio para estimar as porções consumidas nas refeições e (5) evitar suscetibilidade às diferenças sociais, permitindo a igualdade de acesso<sup>109,110</sup>.

O presente *software* vem refutar o pouco rigor de outras plataformas existentes no mercado e a ideia de realizar o diário alimentar em papel. É exemplo o estudo realizado por Eysenbach *et al.*, onde analisaram 212 *softwares*/páginas da internet relacionados com nutrição, alimentos e dieta e concluíram que os resultados eram pouco precisos (precisão definida por grau de concordância das informações fornecidas com a melhor evidência médica)<sup>111</sup>. Os critérios de qualidade incluídos no estudo foram a precisão, legibilidade, *design*, divulgação e referências fornecidas.

## 3.2 Avaliação do consumo alimentar

No período em que o estudo decorreu foram enviadas instruções de participação para os 49 funcionários do INSA com crianças com idades inferiores a três anos, mas a amostra final foi de apenas 12 participantes, residentes maioritariamente na zona centro de Portugal continental (tabela 8). Importa notar que os diários alimentares incompletos não foram considerados para a avaliação final do estudo.

**Tabela 8:** Participantes do estudo.

<b>49 Crianças convidadas a participar</b>	
<b>12 Crianças com perfil e diário alimentar completo</b>	
0 - 4 meses	0 participantes
5 – 12 meses	6 participantes
13 – 36 meses	6 participantes

Verificou-se que não houve participantes dos 0 aos 4 meses, e que os restantes se encontravam distribuídos em igual número pelos grupos de 5-12 meses e 13-36 meses.

Na tabela 9, é possível observar os resultados do consumo alimentar por criança, obtidos através do diário alimentar, em termos de sumos e purés à base de maçã e o total de produtos à base de maçã.

O peso das 12 crianças variou entre 8 Kg e 16 Kg, com um valor médio de 11,9 Kg. O consumo médio diário de sumos variou entre 30 e 133 g (excluindo os que não consumiram sumo), resultando num consumo médio total de 29 g por dia. Quanto aos purés analisados, o consumo médio diário variou entre 15 e 43 g (excluindo os que não consumiram puré), resultando num consumo médio total de 16 g por dia. Estes resultados perfazem um consumo médio total de produtos à base de maçã de 43g, com um consumo mínimo de 17 g e um máximo de 150 g (excluindo os participantes que não consumiram qualquer produto).

**Tabela 9:** Resultado do consumo alimentar por criança, em termos, de sumos e purés e sumos à base de maçã.

Criança	Peso corporal (Kg)	Idade (meses)	Consumo de sumos à base de maçã (g)			Consumo de sumo total (3 dias) (g)	Consumo médio de sumo (g/dia)	Consumo de purés à base de maçã (g)			Consumo de puré total (3 dias) (g)	Consumo médio de puré (g/dia)	Consumo total de produtos à base de maçã (g)			Consumo de produtos à base de maçã total (3 dias) (g)	Consumo médio de produtos à base de maçã (g/dia)
			Dia 1	Dia 2	Dia 3			Dia 1	Dia 2	Dia 3			Dia 1	Dia 2	Dia 3		
1	8	8	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
2	13,3	9	0	90	0	90	30	0	0	45	45	15	0	90	45	135	45
3	8,8	11	0	0	0	0	0	0	97	0	97	32	0	97	0	97	32
4	10	12	0	0	105	105	35	0	0	0	0	0	0	0	105	105	35
5	12	12	0	0	0	0	0	50	0	0	50	17	50	0	0	50	17
6	10	12	120	0	0	120	40	60	0	0	60	20	180	0	0	180	60
7	13	15	0	0	0	0	0	0	60	0	60	20	0	60	0	60	20
8	10,5	15	120	0	0	120	40	0	0	0	0	0	120	0	0	120	40
9	14	20	0	0	200	200	67	90	0	0	90	30	90	0	200	290	97
10	14	22	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
11	13	25	80	120	200	400	133	80	0	50	130	43	80	120	250	450	150
12	16	33	0	0	0	0	0	60	0	0	60	20	60	0	0	60	20
<b>Média</b>	11,9					86	29				49	16	48	31	50	129	43



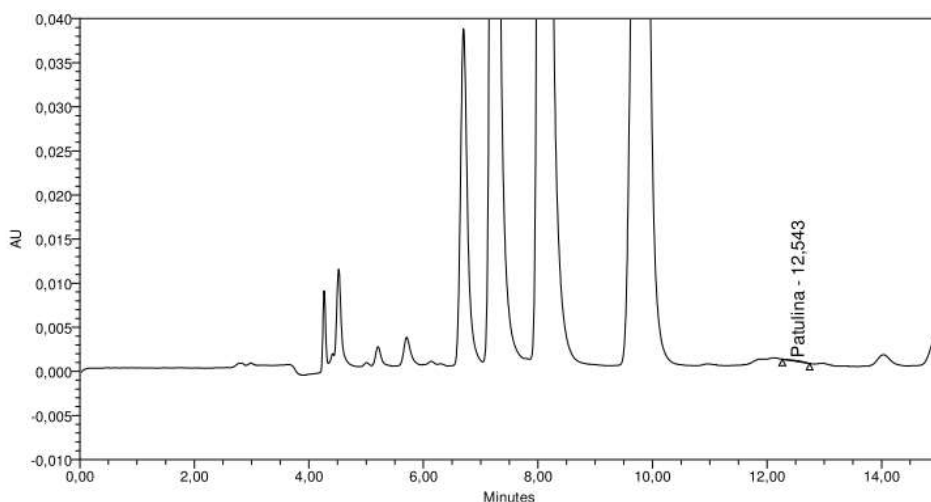
Os alimentos como a maçã e seus derivados são muito consumidos nos primeiros anos de vida e o fruto em si é introduzido na dieta das crianças entre os seis e os oito meses. Logo, das 12 crianças em estudo, apenas duas não consumiram qualquer produto à base de maçã, referindo que uma das crianças tem apenas oito meses e iniciou recentemente a sua alimentação complementar. Para o cálculo da estimativa de ingestão deve-se considerar apenas os consumidores.

Os primeiros dois dias do estudo corresponderam ao consumo alimentar durante a semana, cuja ingestão demonstrou ser ligeiramente inferior ao consumo durante o fim-de-semana, com um valor de consumo total médio de 50 g. O consumo máximo detetado no estudo foi nos sumos, com um valor de 200 g/dia.

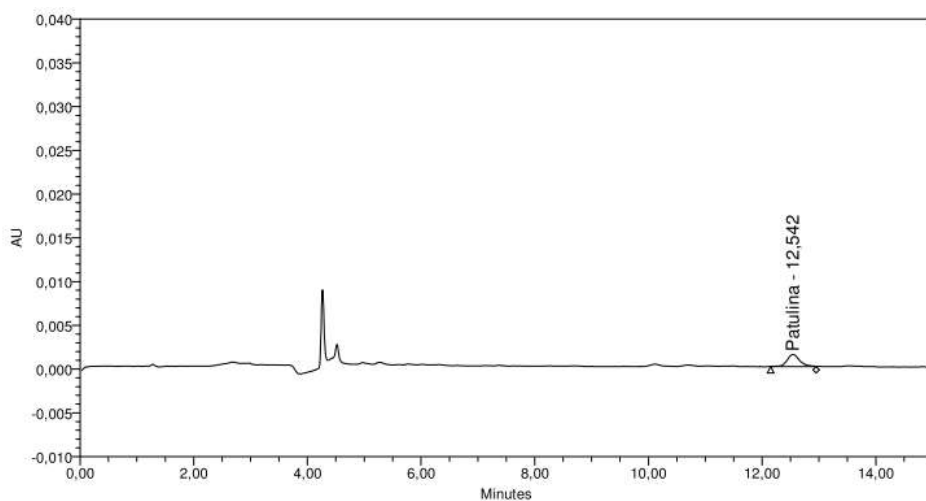
### 3.3 Ocorrência de patulina nas amostras em estudo

O método SPE-HPLC-UV validado e utilizado no DAN para a determinação de patulina foi aplicado às 14 amostras de alimentos infantis, nomeadamente quatro purés de fruta e dez sumos à base de maçã (Anexo 2).

A figura 15 e 16 representam os cromatogramas de uma amostra de puré de maçã e de sumo de maçã, respetivamente.



**Figura 15:** Exemplo de um cromatograma de uma amostra de puré naturalmente contaminada com patulina (0,99 µg/Kg).



**Figura 16:** Exemplo de um cromatograma de uma amostra de sumo naturalmente contaminada com patulina (9,54  $\mu\text{g/Kg}$ ).

No estudo obteve-se teores de patulina entre os 0,09  $\mu\text{g/Kg}$  e os 9,54  $\mu\text{g/Kg}$  nos sumos e, entre os 0,09  $\mu\text{g/Kg}$  e 0,99  $\mu\text{g/Kg}$  nos purés. Os resultados das amostras encontram-se representados na tabela 10.

**Tabela 10:** Teores de patulina determinado nas amostras de sumo e puré à base de maçã.

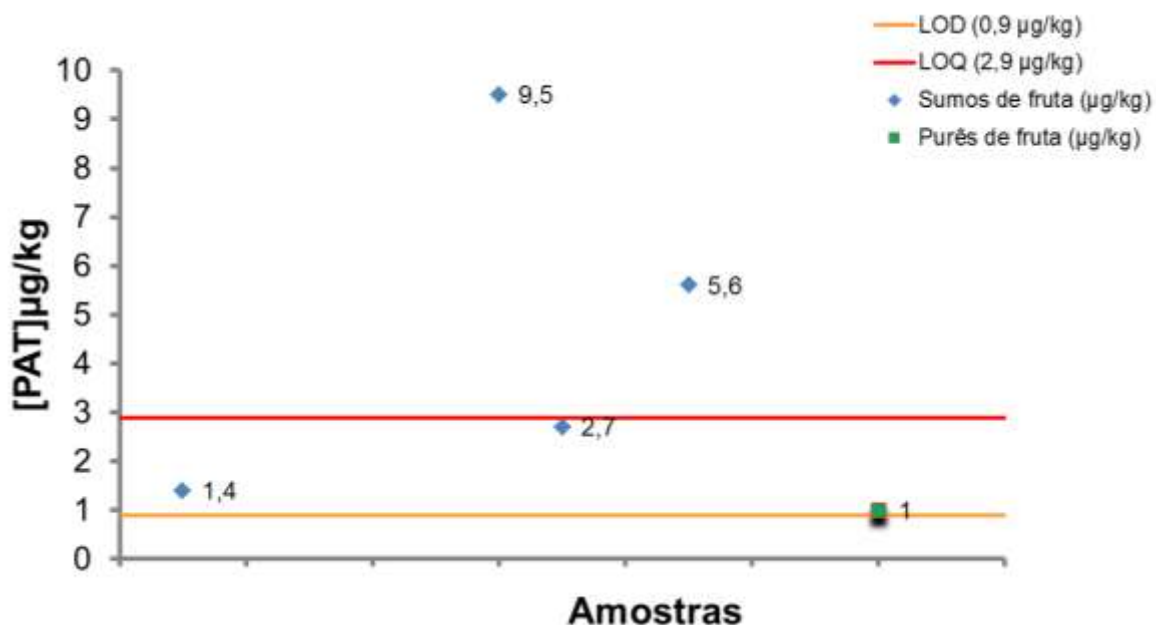
Produto alimentar	Teor em patulina (µg/Kg)	
<b>Sumos</b>	1,38	> LOD
	0,08	< LOD
	0,16	< LOD
	0,05	< LOD
	0,09	< LOD
	9,54	> LOQ
	2,74	> LOD
	0,84	< LOD
	5,58	> LOQ
	0,81	< LOD
<b>Purés</b>	0,34	< LOD
	0,99	> LOD
	0,09	< LOD
	0,09	< LOD

As taxas de recuperação obtidas nas determinações foram em média, para os purés de 80% (n=4) e para os sumos de 70% (n=10). A taxa de recuperação mais baixa foi obtida para os sumos de maçã 100% (51%), cumprindo no entanto os requisitos do regulamento (CE) 401/2006 (R=50-120% para concentrações de patulina inferiores a 20 µg/kg)<sup>74</sup>. A diferença de duplicados (DD%) foi inferior a 30%, estando de acordo com os critérios estabelecidos para teores de patulina inferiores a 20 µg/kg<sup>74</sup>.

Dos quatro purés analisados, três apresentaram teores de patulina inferiores ao LOD (75%) e, uma amostra com o teor entre o LOD e LOQ (25%). Dos 10 sumos analisados,

seis tinham teores inferiores ao LOD (60%), dois apresentaram teores de patulina entre LOD e LOQ (20%) e dois com concentração de patulina superior ao LOQ (20%). No total das 14 amostras analisadas, nove apresentam teores inferiores ao LOD (64%), três amostras com teores entre o LOD e LOQ (21%) e duas amostras com teores acima do LOQ (14%).

O gráfico 1 representa os resultados da ocorrência de patulina nas amostras estudadas ( $\mu\text{g/kg}$ ). Cerca de 35,7% das amostras apresentam um valor de patulina superior ao LOD.



**Gráfico 1:** Ocorrência de patulina ( $\mu\text{g/Kg}$ ) nas amostras de purés e sumos à base de maçã.

Para a avaliação da exposição os valores de ocorrência foram ajustados através do método de substituição recomendado pela AESA, ou seja, tendo em conta o valor do LOD ( $0,9 \mu\text{g/Kg}$ ) e do LOQ ( $2,9 \mu\text{g/Kg}$ )<sup>105</sup>. Para calcular a concentração média ajustada de patulina nos sumos e purés à base de maçã, atribuiu-se às amostras com uma concentração de patulina superior ao LOD e inferior ao LOQ o valor de ocorrência igual ao LOQ e às amostras com uma concentração inferior ao LOD o valor de ocorrência igual ao LOD (Tabela 11). Estes limites foram previamente determinados pelo Laboratório de química do INSA.

**Tabela 11:** Correspondência dos valores da ocorrência com os valores do LOD e LOQ para a avaliação de exposição.

Valor de ocorrência (µg/Kg)	Atribuição
< 0,9	LOD (0,9 µg/Kg)
> 0,9 e < 2,9	LOQ (2,9 µg/Kg)
> 2,9	Resultado determinado

Na tabela 12 apresentam-se os resultados da concentração média de patulina determinada a partir das 14 amostras analisadas, sem e com valores de ocorrência ajustados.

**Tabela 12:** Concentração média de patulina nos purés e sumos à base de maçã (comercializados em Portugal).

	Amostras (n)				Patulina (µg/Kg)				
	Total	< LOD	LOD - LOQ	> LOQ	□ Média	□ Média ajustada	Mediana	Mediana ajustada	Máximo
<b>Purés à base de maçã</b>	4	3	1	0	0,33	1,40	0,17	0,90	0,99
<b>Sumos à base de maçã</b>	10	6	2	2	2,13	2,63	0,83	0,90	9,54
<b>Total</b>	14	9	3	2	1,61	2,28	0,58	0,90	9,54

Das 14 amostras de puré e sumo analisadas foram detetados teores de patulina acima do limite de deteção em 12, verificando-se no total uma concentração média ajustada de 2,28 µg/Kg e um valor máximo de 9,54 µg/Kg. De acordo com a diferença entre as duas

matrizes estudadas, verifica-se que o teor médio ajustado de patulina é maior nos sumos (2,63 µg/Kg) do que nos purés (1,40 µg/Kg).

A variação observada entre as matrizes estudadas ilustra que os níveis de micotoxina podem variar consoante a qualidade das frutas utilizadas na produção dos alimentos e as condições de armazenamento dos frutos que são utilizados na produção. É também de referir que a maioria dos sumos ingeridos pelas crianças, destinam-se à alimentação dos adultos.

Os teores de patulina determinados nas amostras encontram-se abaixo dos teores legislados para alimentos à base de maçã destinados a lactentes e crianças jovens (10 µg/Kg) e sumos de fruta (50 µg/Kg).

Neste estudo, os teores obtidos são inferiores aos obtidos por Barreira *et al.*, estudo realizado em Portugal. Este incluiu 144 produtos à base de maçã, entre os quais, 68 sumos e 76 purés<sup>16</sup>. Os resultados revelaram que a patulina foi detetada em 23% das amostras e com um teor máximo de 42 µg/Kg num sumo. Apenas 7% dos purés apresentaram contaminação, com um teor máximo de 5,7 µg/Kg. As amostras encontravam-se, no entanto, todas abaixo dos teores regulamentados.

O mesmo se sucede com outros autores. K. Baert *et al.* refere que 12% dos sumos à base de maçã comercializados na Bélgica estavam contaminados por patulina<sup>112</sup> e L. González-Osnaya *et al.* refere também que 11% das amostras de purés de maçã e sumos de maçã comercializados na Espanha e analisados no seu estudo tinham valores positivos superiores ao legislado<sup>90</sup>. K. Burda detetou patulina em 23% das amostras à base de frutas do Reino Unido, sendo que 22% destas continham níveis de patulina entre 51 e 1130 µg/L<sup>113</sup>. O estudo efetuado no Irão, revelou em 33% das amostras de sumos de maçã com teor em patulina superior a 50 µg/L e com um valor máximo de 285 µg/L<sup>114</sup>.

### **3.4 Estimativa da exposição das crianças**

Com base nos resultados de consumo alimentar das crianças (3.2.) e da ocorrência de patulina nas amostras de purés e sumos à base de maçã (3.3.) estimou-se a ingestão de patulina diária (µg patulina/Kg peso corporal/dia). Para o cálculo da estimativa de ingestão apenas se considerou os consumidores.

A tabela 13 apresenta os resultados relativos à estimativa da ingestão de patulina através do consumo de alimentos infantis à base de maçã. Os cenários de exposição derivaram do uso da média, mediana e percentis 90, 95 e 99 da concentração de patulina de todas as amostras de alimentos infantis analisados (n=14). A estimativa da ingestão de patulina é superior nas idades compreendidas entre os 13 e os 36 meses para todos os cenários.

**Tabela 13:** Estimativa da ingestão de patulina através do consumo de alimentos infantis à base de maçã. Os cenários de exposição derivaram do uso da média, mediana e percentis 90, 95 e 99 da concentração de patulina de todas as amostras de alimentos infantis analisados (n=14).

			Estimativa da ingestão de patulina para os diferentes cenários de concentração (µg/Kg peso corporal/dia)				
Idade	Média de peso corporal	Média de consumo total/dia	Média	Mediana	P 90	P 95	P 99
Meses	(Kg)	(g/dia)	(2,28 µg/Kg)	(0,90 µg/Kg)	(4,79 µg/Kg)	(6,97 µg/Kg)	(8,99 µg/Kg)
5 - 12	10,8	37,8	0,0080	0,0032	0,0168	0,0244	0,0315
13 - 36	13,3	65,3	0,0112	0,0044	0,0235	0,0342	0,0441

A diferença verificada num pior cenário possível (P 99) entre os grupos etários, nomeadamente maior nas idades entre os 13 e 36 meses, pode ser justificado pelo aumento das necessidades nutricionais (aumento da ingestão alimentar) e consequentemente, neste caso, maior consumo de sumos e purés.

A ingestão diária de patulina estimada num pior caso de exposição possível foi de 0,0441 µg patulina/Kg peso corporal/dia, encontrando-se, no entanto, muito abaixo da dose diária

admissível máxima provisória (DDAMP) que é de 0,43 µg patulina/Kg peso corporal/dia (tabela 13).

A tabela 14 mostra os resultados em percentagem da dose diária admissível máxima provisória (DDAMP) para os diferentes cenários de exposição derivados do uso da média, mediana e percentis 90, 95 e 99 da concentração de patulina de todas as amostras de alimentos infantis analisadas.

A ingestão de patulina através do consumo de sumos e purés à base de maçã, variou entre 1,9% e 2,6% da DDAMP, para a concentração média de patulina nas amostras analisadas. Para o pior cenário possível (P 99) a ingestão de patulina atingiu os 10% da DDAMP.

**Tabela 14:** Percentagem de dose diária admissível máxima provisória (DDAMP) para os diferentes cenários de exposição utilizando a média, mediana e percentis de concentrações de patulina.

Idade Meses	% de DDAMP				
	Média (2,28 µg/Kg)	Mediana (0,90 µg/Kg)	P 90 (4,79 µg/Kg)	P 95 (6,97 µg/Kg)	P 99 (8,99 µg/Kg)
5 - 12	1,9	0,7	3,9	5,7	7,3
13 -36	2,6	1,0	5,5	8,0	10,3

Existem poucos estudos sobre a ingestão diária de patulina através do consumo de maçã em crianças. As referências bibliográficas existentes indicam valores de exposição variadas mas, em muitos casos superiores ao legislado.

Mesmo assim, é sugerido por Baert *et al.* que se reduza o limite máximo da concentração de patulina nos alimentos de modo a salvaguardar a população mais vulnerável<sup>115</sup>. A FDA refere como ingestão média diária de patulina o valor de 0,14 µg/Kg peso corporal para todas as idades e 0,8 µg/Kg peso corporal para idades entre os 12 e 24 meses, tendo como base a ingestão de 200 a 216 g diárias de sumo de maçã<sup>92</sup>.



## Capítulo IV - Conclusões e perspetivas futuras

A presente tese abrange quatro áreas de estudo distintas mas complementares, que procuram facultar novas bases de estudo em Portugal: (1) o desenvolvimento de uma plataforma nutricional *online* capaz de ser utilizada como diário alimentar; (2) obtenção de dados de consumo alimentar de crianças, (3) obtenção de dados relativos ao teor de patulina em alimentos infantis à base de maçã e (4) a avaliação da exposição à micotoxina patulina de crianças através do consumo de sumos e purés à base de maçã.

O desenvolvimento e o aperfeiçoamento de novas ferramentas para a avaliação do consumo alimentar é muito importante, principalmente quando estas podem ser aplicadas a crianças. Em Portugal já existe *softwares* de apoio à nutrição que incluem a avaliação do consumo alimentar, no entanto, ou são exclusivos de nutricionistas e gestores clínicos e a sua utilização requer pagamento, ou a sua utilização é pouco versátil. Assim, é fulcral o desenvolvimento de uma ferramenta prática, económica, utilizada tanto por profissionais de saúde como pelos restantes indivíduos.

Pela rapidez na obtenção de resultados, pela facilidade que a internet proporciona, tanto ao profissional de saúde como ao utilizador comum e pelo fato dos dados nutricionais terem como base a tabela da composição dos alimentos Portuguesa pode considerar-se que a OPEN Portugal é uma ferramenta inovadora em Portugal.

A partir da informação retida na OPEN Portugal através do diário alimentar das 12 crianças participantes, realizado durante a semana e fim-de-semana, verificou-se que o consumo de produtos à base de maçã é ligeiramente superior durante o fim-de-semana que durante a semana. Constatou-se ainda que o consumo de sumos foi superior ao de purés, com um valor de ingestão média total das crianças (nos 3 dias) de 86 g e 49 g, respetivamente.

Uma das dificuldades deste estudo prendeu-se com o reduzido número de participantes, necessários para uma avaliação estatística do consumo alimentar de crianças entre os 0 e 36 meses. Este reduzido nível de cooperação pode dever-se ao facto do contacto ter sido via *e-mail*.

A introdução das frutas inicia-se no 6º mês de vida e é a partir desta idade que se desenrola um período de adaptação a alguns alimentos compostos. Esta afirmação está em concordância com o presente estudo, dado que crianças com idades inferiores aos 12 meses apresentam valores de consumo de produtos à base de maçã inferiores aos com idades compreendidas entre os 13 e 36 meses.

Com os resultados da ocorrência de patulina, micotoxina produzida por certas espécies de fungos que, com alguma frequência, são detetados em maçãs e seus produtos derivados, foi possível concluir que das 14 amostras analisadas, a patulina foi detetada com uma contaminação média nos sumos de 2,13 µg/kg e nos purés de 0,33 µg/kg (valores não ajustados). O teor de patulina foi determinado em cinco amostras acima do LOD.

O estudo indicou que os produtos destinados a lactentes e crianças jovens apresentam níveis reduzidos de contaminação com patulina (< 10 µg/kg) e que os níveis de patulina encontrados em sumos, são superiores aos encontrados nos produtos para alimentação infantil, embora sempre inferiores aos legislados (<50 µg/kg). Considerando que os níveis de patulina presentes em alimentos à base de maçã constituem um bom indicador da qualidade da fruta utilizada no seu fabrico, os resultados indicam que, de um modo geral, as maçãs utilizadas no fabrico dos alimentos destinados às crianças são de qualidade aceitável. É de salientar também que grande parte dos sumos consumidos por crianças e analisados neste estudo, não são destinados à alimentação infantil.

Estes dados contribuíram, juntamente com os dados de consumo alimentar das crianças, para uma avaliação da exposição deste grupo de crianças a esta micotoxina. A ingestão diária de patulina estimada num pior caso de exposição possível (P99) foi de 0,0441 µg patulina/Kg peso corporal/dia, encontrando-se, no entanto, muito abaixo da dose diária admissível máxima provisória (DDAMP) que é de 0,43 µg patulina/Kg peso corporal/dia. Pode considerar-se que a ingestão de patulina através do consumo dos produtos analisados contribuiu apenas com cerca de 10% da DDAMP.

Face à ausência de referências bibliográficas, considera-se que, até à data, o presente estudo foi o primeiro realizado em Portugal relativamente à avaliação de exposição a patulina de crianças portuguesas através do consumo de alimentos infantis à base de maçã. O estudo efetuado embora não tenha valor estatístico permitiu criar todas as ferramentas necessárias a estudos de avaliação da exposição.

Sugere-se nos estudos futuros a realizar em Portugal, que se considere a importância de aumentar o número e tipo de produtos analisados. Este aumento permitirá obter um resultado com significado estatístico da incidência de contaminantes em produtos consumidos pelas crianças, dado à maior vulnerabilidade desta faixa etária.

Relativamente à OPEN Portugal, sugere-se a introdução de dados nutricionais e de contaminação dos alimentos portugueses destinados à alimentação infantil, a sua aplicação diversos tipos de estudos, a sua melhoria continua (introdução de novos itens de caracterização, novos tipos de questionários de avaliação alimentar além do diário alimentar) e a sua disponibilização ao público em geral.

## Capítulo V - Bibliografia

1. Poínhos, R. *et al.* Alimentação e estilos de vida da população Portuguesa: metodologia e resultados preliminares. *Soc. Port. Ciências da Nutr. e Aliment.* **15**, 43–60 (2009).
2. Rotaru, G. & Borda, D. *Safety Models: HACCP and Risk Assessment. Food Saf.* 225–238 (Springer US, 2007). at <[http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-0-387-33957-3\\_11#page-1](http://link.springer.com/chapter/10.1007%2F978-0-387-33957-3_11#page-1)>
3. Knudsen, I. B. & Østergaard, G. The applicability of the ADI (Acceptable Daily Intake ) for food additives to infants and children. *Food Addit. Contam.* **15**, 63–74 (1998).
4. Michaelsen, K. F., Weaver, L., Branca, F. & Robertson, A. Feeding and Nutrition of Infants and Young Children. *Guidel. Who Eur. Reg. With Emphas. Former Sov. Countries. WHO* **87**, 288 (2000).
5. Scotter, M. . J. & Castle, L. Chemical interactions between additives in foodstuffs: a review. *Food Addit. Contam.* **21**, 93–124 (2004).
6. Silva, D. O., Engstrom, E. M. & Zaborowski, E. L. *Instrumento para o combate aos distúrbios nutricionais na atenção a saúde: o diagnóstico coletivo. SISVAN 187* (Fiocruz, 2002). at <<http://books.google.pt/books?id=kbqRAAAACAAJ>>
7. D'Mello, J. P. F. *Food Safety: Contaminants and Toxins.* 452 (CABI, 2003).
8. Borchers, A., Teuber, S. S., Keen, C. L. & Gershwin, M. E. Food safety. *Clin. Rev. Allergy Immunol.* **39**, 95–141 (2010).
9. Rodrigues, S. S. P., Caraher, M., Trichopoulou, A. & de Almeida, M. D. V. Portuguese households' diet quality (adherence to Mediterranean food pattern and compliance with WHO population dietary goals): trends, regional disparities and socioeconomic determinants. *Eur. J. Clin. Nutr.* **62**, 1263–72 (2008).
10. European Food Safety Authority. Guidance document for the use of the Concise European Food Consumption Database in Exposure Assessment. *Data Collect. Expo.* **1**, 8 (2008).
11. FAO/WHO. *Principles and methods for the risk assessment of chemicals in food. IPCS 2* – 92 (2009).
12. Seventh framework programme. *Pan-European Total Diet Study.* 71 (2011).
13. FAO/WHO. *Codex Alimentarius Commission procedural manual.* (Codex Alimentarius Commission, 2008).

14. Baert, K. *et al.* Free and bound patulin in cloudy apple juice. *Food Chem.* **100**, 1278–1282 (2007).
15. Bennett, J. W. & Klich, M. Mycotoxins. *Clin. Microbiol. Rev.* **16**, 497–516 (2003).
16. Barreira, M. ., Alvito, P. C. & Almeida, C. M. M. Occurrence of patulin in apple-based-foods in Portugal. *Food Chem.* **121**, 653–658 (2010).
17. Li, J., Wu, R., Hu, Q. & Wang, J. Solid-phase extraction and HPLC determination of patulin in apple juice concentrate. *Food Control* **18**, 530–534 (2007).
18. 2006, D. 2006/141/CE da comissão de 22 de D. de. Formulas para lactentes e fórmulas de transição e que altera a Directiva 1999/21/CE. *J. Of. da União Eur.* 16–35 (2006).
19. WHO. Principles for evaluating health risks in children associated with exposure to chemicals. *Environ. Heal. Criteria* 237 1–351 (2006).
20. Sherif, S. O., Salama, E. E. & Abdel-Wahhab, M. A. Mycotoxins and child health: the need for health risk assessment. *Int. J. Hyg. Environ. Health* **212**, 347–68 (2009).
21. Dewey, K. *Guiding principles for complementary feeding of the breastfed child.* 1–37 (WHO, 2001).
22. Comissão de Nutrição da SPP. Alimentação e nutrição do lactente. *Rev. Med. da Criança e do Adolesc. - Acta pediátrica Port.* **43**, 1–28 (2012).
23. Grupo de Saúde Infantil. Alimentação Infantil no 1ºAno de Vida. *Unidade local de saúde de Matosinhos* (2010).
24. Schindler, J. M., Corbett, D. & Forestell, C. . Assessing the effect of food exposure on children's identification and acceptance of fruit and vegetables. *Eat. Behav.* **14**, 53–6 (2013).
25. Raiola, A., Meca, G., García-Llatas, G. & Ritieni, A. Study of thermal resistance and in vitro bioaccessibility of patulin from artificially contaminated apple products. *Food Chem. Toxicol.* **50**, 3068–72 (2012).
26. Omenn, G. The Genomic Era: A Crucial Role for the Public Health Sciences. *Environ. Health Perspect.* **108**, (2000).
27. Rudén, C. Principles and practices of health risk assessment under current EU regulations. *Regul. Toxicol. Pharmacol.* **44**, 14–23 (2006).
28. Joint Research Centre. Technical Guidance Document on Risk Assessment. *Eur. Chem. Bur. Part II*, 7–179 (2003).

29. Magan, N. & Olsen, M. *Mycotoxins in food: Detection and control*. 3–27 (Woodhead Publishing Ltd., 2004).
30. WHO. Food Consumption and Exposure Assessment of Chemicals. *FAO/WHO Consult.* (1997).
31. U.S Environmental Protection Agency. Guidelines for Carcinogen Risk Assessment. *Risk Assess. Forum EPA/630/P-*, 2–1 – 5–6 (2005).
32. Verger, P. *et al.* Improvement of comparability of dietary intake assessment using currently available individual food consumption surveys. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**, 18–24 (2002).
33. Arcella, D. & Leclercq, C. Assessment of dietary intake of flavouring substances within the procedure for their safety evaluation: advantages and limitations of estimates obtained by means of a per capita method. *Food Chem. Toxicol. an Int. J. Publ. Br. Ind. Biol. Res. Assoc.* **43**, 105–116 (2005).
34. Van Leeuwen, C. J. & Vermeire, T. G. *Risk Assessment of Chemicals: An Introduction*. 1–274 (Springer, 2007).
35. Renwick, A. The intake of intense sweeteners – an update review. *Food Addict. Contam.* **23**, 327–338 (2006).
36. Augusta, A., Cavalcante, M. & Priore, S. E. Food consumption studies: general methodological aspects and its use in the evaluation of children and adolescents aged. *Rev. Bras. Saúde Matern. Infant.* **4**, 229–240 (2004).
37. Fisberg, R., Marchioni, D., Slater, B. & Martini, L. A. *Inquéritos alimentares: métodos e bases científicas*. (Manole, 2005).
38. European Food Safety Authority. General principles for the collection of national food consumption data in the view of a pan-European dietary survey. *EFSA* **7**, 1–51 (2009).
39. Galante, A. P. & Colli, C. Development and use of an frequency questionnaire to evaluate calcium and iron intake. *Rev. Bras. Epidemiol.* **11**, 1–9 (2008).
40. Majem, L. S. & Bartrina, J. A. *Nutrición y salud pública: métodos, bases científicas y aplicaciones científicas*. 168–172 (Masson, 2005).
41. Barbosa, K. B. F. & Monteiro, J. B. R. Estado nutricional, consumo alimentar e risco cardiovascular: um estudo em Universitários. *Rev. Nutr.* **22**, 837–846 (2009).
42. Directive 2003/115/EC of the European Parliament and of the Council of 22 December 2003 amending Directive 94/35/EC on sweeteners for use in foodstuffs. *Off. J. Eur. Union* **5**, L24/65 (2004).

43. Ovesen, L. Validity of dietary assessment methods in children and older people. *TNO Rep. Annex B-11*, 72–75
44. Massey, R. Estimation of daily intake of food preservatives. **60**, 177–185 (1997).
45. Dunford, M. *Sports Nutrition: A Practice Manual for Professionals*. 143–226 (Academy of Nutrition and Dietetics, 2006).
46. Beaton, G. H. Approaches to analysis of dietary data: relationship between planned analyses and choice of methodology. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**, 253S–261S (1994).
47. Marilyn, I. & Sievert, A. Research priorities and recommendations for dietary assessment methodology. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**, 275–280 (1994).
48. Foster, E. Assessing dietary intake in primary school children. 222–225 (2003).
49. Leonard, B. S. *et al.* Accuracy of fourth and fifth-grade with school-lunch students food records compared with school-lunch observations. *Am. J. Clin. Nutr.* 218–220 (1994).
50. Willett, W. *Nutritional Epidemiology*. 18–157 (Oxford University Press, USA, 1998).
51. Frank-Stromborg, M. & Olsen, S. J. *Instruments for Clinical Health-Care Research*. 81–335 (Jones and Bartlett Publishers, 2004).
52. Henn, R. L., Fuchs, S. C., Fuchs, F. D. & Moreira, L. B. Development and validation of a food frequency questionnaire ( FFQ-Porto Alegre ) for adolescent , adult and elderly populations from Southern Brazil. *Cad. Saúde Pública* **26**, 2068–2079 (2010).
53. Subar, A. F. *et al.* Formative research of a quick list for an automated self-administered 24-hour dietary recall. *J. Am. Diet. Assoc.* **107**, 1002–7 (2007).
54. Møller, A. *et al.* A European food consumption survey method. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**, 89–94 (2002).
55. Philippi, S. T., Fisberg, R. M., Slater, B., Marchioni, D. & Fisberg, Regina Mara; Marchioni, D. Validation of Food Frequency Questionnaires - FFQ: methodological considerations. *Rev. Bras. Epidemiol.* **6**, 200–208 (2003).
56. Hulshof, K. F. A. M., Ovesen, L., Amorim, J. A., Biró, G. & Amorim Cruz, J. A. Selection of methodology to assess food intake. *Eur. J. Clin. Nutr.* **56**, 25–32 (2002).
57. McPherson, R. S., Hoelscher, D. M., Alexander, M., Scanlon, K. S. & Serdula, M. K. Dietary Assessment Methods among School-Aged Children: Validity and Reliability. *Prev. Med. (Baltim)*. **31**, S11–S33 (2000).

58. Colditz, A. G. & Rockett, H. R. H. Assessing diets of children and adolescents. *Am. J. Clin. Nutr.* **65**, 1–7 (1997).
59. Livingstone, M. B. *et al.* Daily energy expenditure in free-living children: comparison of heart-rate monitoring with the doubly labeled water method. *Am. J. Clin. Nutr.* **56**, 343–52 (1992).
60. Iheshiulor, O. O. M. *et al.* Effects of mycotoxins ai animal nutrition: A Review. *Asian J. Anim. Sci.* **5**, 19–33 (2011).
61. Milićević, D. R., Skrinjar, M. & Baltić, T. Real and perceived risks for mycotoxin contamination in foods and feeds: challenges for food safety control. *Toxins (Basel)*. **2**, 572–92 (2010).
62. Turner, N. W., Subrahmanyam, S. & Piletsky, S. A. Analytical methods for determination of mycotoxins: A review. *Anal. Chim. Acta* **632**, 168–180 (2009).
63. Njapau, H., Trujillo, S., Van Egmond, H. P. & Park, D. L. *Mycotoxins and Phycotoxins: Advances in Determination, Toxicology, and Exposure Management*. 21–185 (Wageningen Academic Publishers, 2006). at <<http://books.google.pt/books?id=FMVO3Sst-D8C>>
64. Shephard, G. S. Determination of mycotoxins in human foods. *Chem. Soc. Rev.* **37**, 2468–77 (2008).
65. Kabak, B., Dobson, A. D. W. & Var, I. Strategies to Prevent Mycotoxin Contamination of Food and Animal Feed: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **46**, 593–619 (2006).
66. Breitenbach, M., Cramer, R. & Lehrer, S. B. *Fungal Allergy and Pathogenicity*. 310 (Karger, 2002). at <[http://books.google.pt/books?id=GAF3\\_1FhoSoC](http://books.google.pt/books?id=GAF3_1FhoSoC)>
67. Barug, D., Van Egmond, H. P., López-García, R., Van Osenbruggen, T. & Visconti, A. *Meeting the Mycotoxin Menace*. 319 (Wageningen Academic Pub., 2004).
68. Barug, D. *et al.* *The Mycotoxin Factbook: Food & Feed Topics*. 384 (Wageningen Academic Publishers, 2006). at <[http://books.google.pt/books?id=YEyvyGZdE\\_4C](http://books.google.pt/books?id=YEyvyGZdE_4C)>
69. Martins, M. L., Martins, H. M. & Bernardo, F. Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *Rev. Port. Ciências Veterinárias* **98**, 179–183 (2003).
70. Speijers, G. J. A. & Speijers, M. H. M. Combined toxic effects of mycotoxins. *Toxicol. Lett.* **153**, 91–8 (2004).
71. Songsermsakul, P. & Razzazi-Fazeli, E. A Review of Recent Trends in Applications of Liquid Chromatography-Mass Spectrometry for Determination of Mycotoxins. *J. Liq. Chromatogr. Relat. Technol.* **31**, 1641–1686 (2008).



72. Serrano, A. ., Font, G., Ruiz, M. J. & Ferrer, E. Co-occurrence and risk assessment of mycotoxins in food and diet from Mediterranean area. *Food Chem.* **135**, 423–9 (2012).
73. Regulamento (CE) N.º 1881/2006 da comissão de 19 de Dezembro de 2006. Teores máximos de certos contaminantes presentes nos géneros alimentícios. *J. Of. da União Eur.* **L**, 5–24 (2006).
74. Regulamento (CE) N.º 401/2006 da Comissão de 23 de Fevereiro. Métodos de amostragem e de análise para o controlo oficial dos teores de micotoxinas nos géneros alimentícios. *J. Of. da União Eur.* **L70**, 12–34 (2006).
75. Van Egmond, H. P., Schothorst, R. C. & Jonker, M. . Regulations relating to mycotoxins in food: perspectives in a global and European context. *Anal. Bioanal. Chem.* **389**, 147–57 (2007).
76. Castillo, J. M. S. *Micotoxinas en alimentos*. 396 (Diaz de Santos, 2007). at <[http://books.google.pt/books?id=wgRVcFvk--IC&dq=Micotoxinas+en+alimentos&hl=pt-PT&source=gbs\\_navlinks\\_s](http://books.google.pt/books?id=wgRVcFvk--IC&dq=Micotoxinas+en+alimentos&hl=pt-PT&source=gbs_navlinks_s)>
77. Khayoon, W. S. *et al.* Determination of aflatoxins in animal feeds by HPLC with multifunctional column clean-up. *Food Chem.* **118**, 882–886 (2010).
78. Betina, V. Chromatography of Mycotoxins: Techniques and Applications. *J. Chromatogr. Libr.* **54**, 433 (1993).
79. Wild, C. P. & Gong, Y. Y. Mycotoxins and human disease: a largely ignored global health issue. *Carcinogenesis* **31**, 71–82 (2010).
80. Villa, P. & Markaki, P. Aflatoxin B1 and ochratoxin A in breakfast cereals from athens market: Occurrence and risk assessment. *Food Control* **20**, 455–461 (2009).
81. Mahnine, N., Meca, G., Fernández-Franzón, M., Manes, J. & Zinedine, A. Occurrence of fumonisins B1 , B2 and B3 in breakfast and infant cereals from Morocco. *Phytopathol. Mediterr.* **51**, 193–198 (2012).
82. Adams, M. R. & Moss, M. O. *Food Microbiology*. (Royal Society of Chemistry, 2007). at <<http://books.google.pt/books?id=g4zkCkoQRQ0C>>
83. Richard, J. L. Some major mycotoxins and their mycotoxicoses--an overview. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 3–10 (2007).
84. Zinedine, A. & Mañes, J. Occurrence and legislation of mycotoxins in food and feed from Morocco. *Food Control* **20**, 334–344 (2009).
85. Zöllner, P. & Mayer-Helm, B. Trace mycotoxin analysis in complex biological and food matrices by liquid chromatography-atmospheric pressure ionisation mass spectrometry. *J. Chromatogr. A* **1136**, 123–69 (2006).

86. European Food Safety Authority. Statement on recent scientific information on the toxicity of Ochratoxin A. *EFSA J.* **8**, 2–8 (2010).
87. Moake, M. M., Padilla-Zakour, O. I. & Worobo, R. W. Comprehensive review of patulin control methods in foods. *Comprehensive Rev. Food Sci. Food Saf.* **4**, 8–21 (2005).
88. Murillo-Arbizu, M., Amézqueta, S., González-Peñas, E. & Cerain, A. L. Occurrence of patulin and its dietary intake through apple juice consumption by the Spanish population. *Food Chem.* **113**, 420–423 (2009).
89. Welke, J. E., Hoeltz, M., Dottori, H. A. & Noll, I. B. Occurrence, toxicological aspects, analytical methods and control of patulin in food. *Ciência Rural* **39**, 300–308 (2009).
90. González-Osnaya, L., Soriano, J. M., Moltó, J. C. & Mañes, J. Exposure to patulin from consumption of apple-based products. *Food Addit. Contam.* **24**, 1268–1274 (2007).
91. Baden-Württemberg. Patulin Residues in Apple Products. *Investig. from Year 2012* (2012). at  
<[http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema\\_ID=12&ID=1660&Pdf=No](http://www.cvuas.de/pub/beitrag.asp?subid=1&Thema_ID=12&ID=1660&Pdf=No)>
92. United States Food and Drug Administration & Center for Food Safety and Applied Nutrition. Patulin in apple juice, apple juice concentrates and apple juice products. *Washingt. FDA* (2001). at  
<<http://www.fda.gov/food/foodborneillnesscontaminants/naturaltoxins/ucm212520.htm>>
93. MacDonald, S., Long, M., Gilbert, J. & Felgueiras, I. Liquid chromatographic method for determination of patulin in clear and cloudy apple juices and apple puree: collaborative study. *J. AOAC Int.* **83**, 1387–94 (2000).
94. Rychlik, M., Kircher, F., Schusdziarra, V. & Lippl, F. Absorption of the mycotoxin patulin from the rat stomach. *Food Chem. Toxicol.* **42**, 729–35 (2004).
95. Gibbs, P. *et al.* *Qualidade, Segurança & Inovação: Pesquisa de patulina em maçãs “Bravo Esmolfe” e “Golden Delicious.”* 229 – 230 (2001).
96. Report of experts participating in Task 3.2.8. *Assessment of dietary intake of Patulin by the population of EU Member States.* 1–138 (2002).
97. Beretta, B., Gaiaschi, A., Galli, C. L. & Restani, P. Patulin evaluation in apple-based food: Occurrence and safety evaluation. *Food Addit. Contam.* **17**, 399–406 (2000).
98. Thuvander, A. *et al.* Dietary intake of some important mycotoxins by the Swedish population. *Food Addit. Contam.* **18**, 696–706 (2001).

99. Tangni, E. K. *et al.* Patulin in domestic and imported apple-based drinks in Belgium: Occurrence and exposure assessment. *Food Addit. Contam.* **20**, 482–489 (2003).
100. 2003/598, R. (CE). Prevenção e redução da contaminação por patulina do sumo de maçã e dos ingredientes do sumo de maçã noutras bebidas. *Jornal L203*, 54–59 (2003).
101. Probst, Y. C. & Tapsell, L. C. Overview of computerized dietary assessment programs for research and practice in nutrition education. *J. Nutr. Educ. Behav.* **37**, 20–6
102. Stein, K. It All Adds Up: Nutrition Analysis Software Can Open the Door to Professional Opportunities. *J. Am. Diet. Assoc.* **111**, S31–S35 (2011).
103. Seljak, B. K. Computer-based dietary menu planning. *J. Food Compos. Anal.* **22**, 414–420 (2009).
104. Jozef Stefan Institute. Open platform for clinical nutrition. at <[http://www.opkp.si/en\\_GB/cms/introduction](http://www.opkp.si/en_GB/cms/introduction)>
105. European Food Safety Authority. Management of left-censored data in dietary exposure assessment of chemical substances. *EFSA J.* **8**, 1557 (2010).
106. EURACHEM. The fitness for purpose of analytical methods - a laboratory guide to method validation and related topics. (2003). at <<http://www.eurachem.org/guides/mval.htm>>
107. Arranz, I. *et al.* Determination of patulin in apple juice and fruit puree by liquid-liquid extraction and solid phase extraction with liquid chromatography using ultraviolet absorption: collaborative study. *Food Technol. food Saf.* (European Commission, Directorate-General, Joint Research Centre, 2004).
108. Reslan, S., Saules, K. K. & Greenwald, M. K. Validation of an online questionnaire measure of the relative reinforcing value of food. *Eat. Behav.* **13**, 278–80 (2012).
109. Kohlmeier, L. Gaps in dietary assessment methodology: meal vs list-based methods. *Am. J. Clin. Nutr.* **59**, 175–9 (1994).
110. Rebro, S. M., Patterson, R. E., Kristal, A. R. & Cheney, C. L. The effect of keeping food records on eating patterns. *J. Am. Diet. Assoc.* **98**, 1163–5 (1998).
111. Eysenbach, G., Powell, J., Kuss, O. & Sa, E. Empirical studies assessing the quality of health information for consumers on the world wide web: a systematic review. *JAMA* **287**, 2691–2700 (2002).
112. Baert, K., Devlieghere, F., Amiri, A. & Meulenaer, B. De. Evaluation of strategies for reducing patulin contamination of apple juice using a farm to fork risk assessment model. *Int. J. Food Microbiol.* **154**, 119–129 (2012).

113. Burda, K. Incidence of patulin in apple, pear and mixed fruit products marketed in New South Wales. *J. Food Prot.* **55**, 796–798 (1992).
114. Majid Cheraghali, A. *et al.* Incidence of patulin contamination in apple juice produced in Iran. *Food Control* **16**, 165–167 (2005).
115. Baert, K. *et al.* Variability and uncertainty assessment of patulin exposure for preschool children in Flandres. *Food Chem. Toxicol.* **45**, 1745–1751 (2007).

## Anexo I

Instituto Nacional de Saúde  
Dr. Ricardo Jorge



Departamento de Alimentação e Nutrição

### Informação para os Pais

Exmo(a) Pai/Mãe,

A "Plataforma de Nutrição Clínica Portuguesa" é um software, que permitirá no futuro, através da introdução do consumo alimentar diário, avaliar o estado nutricional do consumidor, assim como, a exposição a substâncias que poderão ser prejudiciais à saúde. Esta plataforma, existente online noutras línguas, está a ser adaptada para Portugal no Departamento de Alimentação e Nutrição, do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge, I.P. Este estudo está a ser desenvolvido no âmbito da dissertação intitulada "Avaliação da exposição a micotoxinas de um grupo de crianças através do consumo de alimentos infantis à base de maçã – estudo piloto" por Catarina Pereira, aluna do Mestrado em Biologia Humana e Ambiente, da Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa.

Esta plataforma quando terminada será utilizada em projetos de monitorização/investigação a decorrer no Instituto na avaliação da exposição a contaminantes químicos, aditivos alimentares, entre outros.

Com a vossa colaboração no preenchimento e utilização desta plataforma pretende-se melhorar o software através da avaliação das vossas dificuldades, críticas e sugestões e validar o mesmo através do preenchimento da plataforma com o consumo alimentar dos vossos filhos referente a três dias.

Mais informamos que estes dados serão utilizados apenas para os fins mencionados, e não servirão para qualquer informação não solicitada sem o seu consentimento.

### Consentimento informado

Para os devidos efeitos declaro ter lido e compreendido todos os termos deste consentimento,

Nome da criança: \_\_\_\_\_

Nome Pai/Mãe: \_\_\_\_\_

Escolaridade do(a) Pai/Mãe: \_\_\_\_\_

Telefone: \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

Assinatura Pai/Mãe: \_\_\_\_\_

Figura 17 Anexo I: Consentimento informado aos pais.

## Anexo II

**Tabela 15 Anexo II:** Características das amostras analisadas.

Produto alimentar	Idade	Ingredientes	Teor em patulina (µg/Kg)	Taxa de recuperação
Sumos	ni	Sumos de fruta (ananás, tangerina, laranja, manga, maçã, goiaba, maracujá, limão, kiwi) à base de concentrados	1,38	75,9
	ni	Sumos de fruta (ananás, tangerina, laranja, manga, maçã, goiaba, maracujá, limão, kiwi) a partir de concentrados	0,08	75,2
	> 6 meses	Sumos de fruta (laranja, maçã, pêra, ananás) à base de concentrado, vitamina C	0,16	91,8
	ni	Sumos de fruta (ananás, tangerina, laranja, manga, maçã, goiaba, maracujá, limão, kiwi) a partir de concentrados	0,05	65,5
	ni	Sumos de fruta (maçã, uva, laranja, ananás, maracujá, goiaba, alperce, manga e banana) à base de concentrados, antioxidante: ácido ascórbico.	0,09	88,7
	ni	Sumo de maçã, vitamina C.	9,54	51,4
	ni	Sumo de maçã, pêra, vitamina C.	2,74	68,6
	ni	Sumo de maçã à base de concentrado.	0,84	78,9
	ni	Maçã (100%), vitamina C.	5,58	52,3
	ni	Maçã, cenoura, vitamina C.	0,81	79,2
Purés	> 6 meses	Puré (maçã, banana, morango), antioxidante: ácido ascórbico	0,34	99,6
	> 6 meses	Puré (Maçã, banana, laranja), antioxidante: ácido ascórbico, vitamina C	0,99	93
	> 4 meses	Puré (pêra, maçã), antioxidante: ácido ascórbico, sumo de limão concentrado	0,09	63,8
	> 18 meses	Puré (maçã, pêra, banana, alperce), antioxidante: ácido ascórbico	0,09	62,1

ni: não identificado.